

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの短期吸入曝露等による
免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法開発
のための研究 (20KD1004)

令和 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 足利太可雄

令和 4 (2022) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究 -----	1
足利 太可雄	

II. 分担研究報告

1. ナノマテリアルの THP-1 細胞への影響評価-----	24
足利 太可雄	
2. ナノマテリアルの吸入曝露実験の実施と解析-----	34
高橋 祐次	
3. ナノマテリアルの in vitro 評価系に関する研究-----	44
飯島 一智	
4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 -----	51
石丸 直澄	
5. ナノマテリアルの in silico 評価系に関する研究-----	61
大野 彰子	
6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響評価に関する研究-----	74
渡辺 渡	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	78

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和3年度 総括研究報告書

研究代表者 足利太可雄
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

研究要旨

ナノマテリアル(NM)は社会実装が進む中、吸入曝露による健康リスクが強く懸念されるところであり、多様な NM の吸入曝露による毒性を効率的かつ高精度に評価できる試験法の開発および国際標準化が喫緊の課題である。そこで我々は、異物排除の根幹を担う抗原提示細胞に対する NM の影響に着目し、in vitro/in vivo 研究の連携体制による評価手法開発のための研究を行っている。具体的には、in vitro において NM が抗原提示細胞株に与える影響の解析、NM の物性と毒性の関係性を解析するための物理化学的性状データの取得と有害性データの情報収集、さらに感染免疫に与える影響も含め in vivo 短期吸入曝露試験を実施した。代表的な皮膚感作性物質 DNBC とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、DNBC は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ相乗効果が認められた。さらにカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かった。銀ナノ粒子においては粒径により THP-1 細胞の活性化能に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。未分化および分化 THP-1 細胞の CD86, CD54, MMP-12 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。5種のナノシリカについて、約 65 項目の物性および in vitro / in vivo 有害性情報を収集・整理し、物性についての特性解析や in vitro/in vivo 有害性データとの関連性解析により、幾つかの物性項目の特徴を見出した。NM204 の高分散乾燥検体を用いて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連續全身ばく露吸入を実施した。その結果、低濃度群 ; $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群 ; $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに $1.5 \mu\text{m}$ 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NW-204 の Taquann 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化し、肺炎増悪化の指標にケモカイン CCL3、CCL5 および sCD54 が利用できる可能性が示された。針状の酸化チタン NM である TiDW 吸入曝露後 4 週において肺組織ならびに BALF 細胞の MMP12 mRNA 発現が上昇し、曝露後 8 週の肺組織で MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が上昇することを明らかとした。また日本化粧品工業連合会および日本化学工業協会と班員との間で意見交換会を実施し、本研究に対する産業界からの要望を伺った。

研究分担者

高橋 祐次

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター

毒性部 動物管理室 室長

飯島 一智

横浜国立大学工学研究院 准教授

石丸 直澄

徳島大学大学院医歯薬学研究部

口腔分子病態学分野 教授

大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター

安全性予測評価部 主任研究官

渡辺 渡

九州保健福祉大学生命医科学部

生命医学科 教授

A. 研究目的

ナノマテリアル(NM)は、従来の粒子に比べて単位重量当たりの比表面積が大きく、細胞内には食作用を介して直接取り込まれるという性質を有するため、健康リスクが強く懸念されており、特に生体において吸入曝露された NM が免疫系に深刻な影響を与えることが示唆されている。そのため NM の適切なリスク評価が必要であるが、従来より行われている *in vivo* 吸入曝露試験は設備面や長期間の観察に多大なりソースを要するため、動物福祉の観点からも、*in vitro* 評価系の開発や国際標準化が喫緊の課題である。

我々のこれまでの研究により、抗原提示細胞の活性化を指標にした *in vitro* 皮膚感作性試験(h-CLAT 試験)の OECD テストガイドライン化を行うとともに、NM が h-CLAT 試験において陽性と判定されることを見出している。また、我々は NM 安全性評価プ

ログラムの評価文書などの情報を用いて物性と有害性情報との関連性について多変量解析法を行い、毒性に関する幾つかの物性項目を見出している。さらに、*in vivo* の先行研究 (H29-化学-一般-003) では、マウスの全身吸入曝露による肺胞マクロファージの機能解析を行った。

本研究班は、短期吸入曝露された各種 NM が免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の AOP (毒性発現経路) および *in vitro* 試験法の確立と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。*In vitro* 試験法研究では、様々な特徴を有する各種 NM の *in vitro* 試験による抗原提示細胞活性化能の評価、物性の測定及び収集・整理を行い、その比較解析結果から毒性メカニズムを解明する。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系を開発し、吸入曝露された各種 NM が免疫系に与える毒性評価法の基盤技術を確立する。*In vivo* 試験法研究では、先行研究で開発した高分散手法を用いて各種 NM のマウスへの短期全身曝露吸入を実施し、肺胞マクロファージに与える影響など、感染免疫を含め免疫機能への影響評価を行うことで、*in vitro* 試験法の改良や結果の生理学的意味に関する知見を得る。

B. 研究方法

B.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成 (足利)

前年度評価対象物質とした二酸化ケイ素ナノマテリアル(以下、ナノシリカ)5種のうち、THP-1細胞におけるCD54の発現誘導能

が最も高かったNM-204を用いて、前年度結果の再現性およびNM-204と他の活性化物質との混合曝露について検討を行った。活性化物質として、代表的な皮膚感作性物質である2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) および代表的な発熱性物質であるLipopolysaccharide (LPS)を用いた。

更に、新たなNMとして分散性の異なるカーボンナノチューブ(分散型:T-MWCNT-7、非分散型:N-MWCNT-7)を用いて、抗原提示細胞活性化能の評価を行った。

抗原提示細胞活性化能の評価方法は、前年度同様 THP-1 細胞の活性化を指標とする *in vitro* 皮膚感作性試験法である h-CLAT (OECD TG442E)に準拠して実施し、陽性・陰性の判断だけでなく強度の指標として発現の濃度閾値(EC150 for CD86 と EC200 for CD54)を求めた。

h-CLAT試験は、被験物質適用のための懸濁液を調製し、以下のように行った。24ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1細胞懸濁液500 μlおよび各被験物質の分散液500 μlを添加し、CO₂インキュベーター内で24時間静置した。被験物質の曝露濃度は予備試験の結果から最高濃度を1000 μg/mlとし、公比√10で希釈して合計8濃度を設定した。陽性判定基準は、OECDテストガイドラインに従い、3回の試験のうち2回以上の試験で、1濃度でもCD86の発現量(RFI)が150%以上、またはCD54の発現量(RFI)が200%以上になった場合とした。

また研究代表者として、本研究に関する産業界の意見を伺い、今後の研究方針設定の参考にする目的で、2021年6月8日の班会議終了後に日本化粧品工業連合会技術委員会安全性部会ナノマテリアルWGおよび日本化学工業協会との意見交換会を実施した。

B.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価 (大野)

B2.1. 本研究で実施する対象化合物: 5種の二酸化ケイ素ナノ粒子

SiO₂ NPs (NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204) were donated by European Commission, Joint Research Center (JRC), JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy).

B.2.2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

OECDで公表されている Silicon dioxide (NM-200—NM-204) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文、また本研究班の足利研究代表者が前年度実施した h-CLAT 毒性試験結果および飯島分担研究者が前年度実施した h-CLAT 毒性試験の溶媒中の物性評価 (Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi) を調査対象情報源とした。

B.2.3. 情報整理及びデータベース (DB) 搭載用のデータシートの作成

有害性情報に関しては、今後、HESS DB [有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称: HESS) : ラットを対象(今回はマウスも対象)とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース] に搭載できるように形式を整理し作成した。

B.2.4. 多変量解析法

収集したデータについて多変量解析ソフトウェアSIMCA17 (Umetrix社製)で解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や毒性の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

①物性 \leftrightarrow ② $in vitro$ 毒性試験結果 (h-CLAT 試験) \leftrightarrow ③ $in vivo$ 毒性試験結果 (鼻部吸入暴露試験)について、共通する物性変数について探索した。

B.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

B.3.1. 各種ナノマテリアル分散液の調製

各種ナノマテリアルの分散液は以下の方法により調製した。

銀ナノ粒子

銀ナノ粒子は BioPureTM 銀ナノ粒子分散液 (nanoComposix, 一次粒径 10.3 ± 1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml および一次粒径 52 ± 6 nm, 濃度 1.04 mg/ml) を用いた。40 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培地を用いて所定濃度まで希釈した。購入時の銀ナノ粒子分散液の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) により測定した。

シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204 (以上 The European Commission's Joint Research Centre (JRC)) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。分散液として購入した Sicastar-F 以外のシリカナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220 °C, 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるようにシリカナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置

(VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で PWM 80%, 5 min の条件で 2 回処理した。これを 2 倍希釈することで stock 溶液とし、培地を用いて所定濃度に希釈した。

二酸化チタンナノ粒子

二酸化チタンナノ粒子は MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上ティカ株式会社) および TiDW (石原産業株式会社) を用いた。二酸化チタンナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220 °C, 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。4 mg/ml の濃度になるように二酸化チタンナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で PWM 80%, 1 min の条件で処理した。培地を用いて所定濃度に希釈し、再度プローブ型超音波装置により同様の条件で処理した。

B.3.2. 表面マーカー発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

h-CLAT (OECD TG442E) に準拠して実施した。

B.3.3. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化は、24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells の THP-1 細胞を播種し、400 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 3 日間、その後 PMA 不含培地で 5 日間培養することで行った。

24 ウェルプレートに播種・培養された未分化および分化 THP-1 細胞に対し、所定濃度の各被験物質の分散液を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置した。培

養後の未分化および分化 THP-1 細胞は PBS で 2 回洗浄し、RNeasy mini を用いて添付のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて、リアルタイム PCR により、*CD86*, *CD54*, *MMP-12*, *GAPDH* 遺伝子の発現を測定し、*GAPDH* を対照とする $\Delta\Delta Ct$ 法により遺伝子発現量を定量した。

B.3.4. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

プロトコルに従い、市販のヒト気管支上皮細胞の気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。気管支上皮モデルの作製は経上皮電気抵抗 (TEER) 測定および標本の形態観察により評価を行なった。ウェルプレートのウェルに未分化 THP-1 細胞の懸濁液を入れ、気管支上皮モデルを含むセルカルチャーチャインサートを設置し、上部もしくは下部よりシリカナノ粒子 (Sicastar-F) 分散液を加えた。24 時間培養後、B.2. の手法にて THP-1 細胞の *CD86*, *CD54* の発現および細胞生存率を測定した。この際、培地として THP-1 細胞の培養に用いる 10% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地を用いた。

B.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備（高橋）

B.4.1 被験物質

1. 被験物質：

被験物質として、EU 共同研究センター (JRC: Joint Research Centre in Ispra,

Italy) から寄付されたナノシリカ (SiO₂-NM204-JRCNM02004) を使用した。

B.4.2 マウス全身ばく露吸入実験

1. 動物：

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。個体識別は耳パンチにより行った。

2. 飼育条件：

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウターケージと PET 製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当たり 5 匹のマウスを収容した。飼育条件は、温度 ; 25±1°C、湿度 ; 55±5%、換気回数 ; 約 20 回/h、照明時間 ; 8 時～20 時点灯 (照明显暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。飲水は滅菌水ディスポーザブルパウチ (Hydropa) を用いて自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック (Shepherd Specialty Papers 社) をケージ内に設置した。

3. 群構成：

HEPA フィルターを通した清浄空気のみを送気した群 (対照群)、NM204 ばく露群 (低濃度、高濃度) の 3 群構成とした。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³ 高濃度群 30 mg/m³ と設定した。各群当たり 48 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた (表 1)。1 日 6 時間 (10 : 00～16 : 00)、5 日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0 用に改変したものを使用した。

NM204 の原末を 35°C に加温した tert-butyl alcohol (TBA) 加えて 2 mg/mL の懸濁液を調整した。TBA 懸濁液を超音波洗浄器 SU-3TH (柴田科学株式会社) にて、40W の出力により 2~15 分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。この懸濁液を Taquann システムで使用するカートリッジに充填した。低濃度群では 3.5 mL/cartridge、高濃度群では 10.5 mL/cartridge を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプ (MD4C NT+AK+EK, Vacuubrand) で TBA を昇華除去することで行った。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.48 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。ばく露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min (基礎換気流量 ; 29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング (CPC) ; 1.5 L/min、質量濃度測定 ; 1.5 L/min) と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、ばく露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入ばく露実験において、合計 88 本のカートリッジを使用し、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。

ばく露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動をばく露時間の 6 時間を通してモニタリングした。

5. ばく露チャンバー

動物を収容し検体をばく露するばく露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0 用に改変したものを使用した。

6. ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/m³) 測定を並行して行った。

相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter : CPC、CPC-BL01、サンプリング流量 : 1.5 L/min、柴田科学) を用いた。高濃度での測定は、CPC に負荷がかかるため、CPC の前段に希釈機 (柴田科学) を設置して 6 倍希釈し測定した。

質量濃度測定は、ローポリウムサンプラー (080050-155、φ 55 mm 紗紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダーガラス纖維フィルター (Model TX40HI20-WW、φ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 99.9%、東京ダイレック) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量でばく露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min = 180 L から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

7. エアロゾルの空気動力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter

(MMAD)

エアロゾルの空気動力学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。吸引時間は40分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI装着前と回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

8. 解剖とサンプリング

肺と縦隔、頸下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後(0W)、4週後(4W)及び8週後(8W)に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシンナー)を用いイソフルラン(ゾエティス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(フジフィルム和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調

節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針(サーフローフラッシュ18G、テルモ)を気管に挿入しPBSを1mL注入・吸引採取する操作を2回繰り返し、BALを採取した。

B.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究(石丸)

R2年度に実施した実験で得られたサンプル解析の継続を実施した。Taquann処理した針状酸化チタン(TiDW)の吸入暴露後、4週および8週での肺組織およびBALF細胞からRNAを抽出し、定量RT-PCR法にて各種関連遺伝子mRNA発現を検討した。加えて、加えて、次年度に計画しているナノシリカ(NM-204)の全身吸入による肺免疫反応の解析を準備しており、これまでのNM吸入暴露実験との比較検討を行う予定である。また、RAW264.7細胞を用いて、T-CNTおよびFLT-300(TiDW)を添加することによる細胞形態、増殖、MMP12 mRNA発現を検討した。

B.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響(渡辺)

B.6.1. ナノシリカ吸入曝露試験

国立衛研においてTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、NW-204を質量濃度10および30mg/m³になるように調整して、BALB/c雌、4週齢のマウスに6時間吸入させた。この実験を1日おきに3回実施した。最終曝露の1日後に曝露マウスは、先行研究と同様にSLC(実験動物ブリーダー)に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

B.6.2 RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株 3×10^5 PFU を麻酔下 (ketamine 40 µg/g, xylazine 6 µg/g、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで-80°Cに保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

B.6.3. 肺重量の計測

NW-204 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存している NW-204 のコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。-80°Cでの凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

B.6.4. BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES)、CCL3 (MIP-1 α)および sCD54(sICAM-1)の定量は R&D Systems 社製の Quantikine mouse ELISA キットを用いた。

B.6.5. 肺組織の病理組織学的解析

肺の標本作成は（株）バイオ病理研究所に委託した。評価は HE、マッソントリクロムおよび PAS 染色下で検鏡観察により実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物実験を実施した研究は、試験実施機関によ

る動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

C.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成（足利）

ナノシリカ NM-204 単独の h-CLAT 試験を実施した結果、CD86 の発現誘導は認められず、CD54 については、10~100 µg/mL の濃度で濃度依存的に強い発現誘導が認められ、前年度の結果の再現性が得られた。

次に DNCB の適用濃度を固定 (4 µg/mL) し、NM-204 と混合曝露(適用濃度 : 0.00316 ~100 µg/mL) した。CD86 の RFI は、294.3 ~316.8 となり、DNCB 単独の RFI である 318.4 ± 30.1 (n=3) と同程度であったことから、混合暴露により相加・相乗効果はないと判断された。CD54 においては、混合暴露の場合の RFI は 462.8~518.3 と DNCB 単独暴露の場合の RFI である 475.9 ± 176.3 (n=3) と同程度の値を示し、10~100 µg/mL の NM-204 単独曝露で認められた RFI の上昇は認められず、DNCB との混合暴露により抑制されていた。

発熱性物質 LPS (1 ng/mL) 単独処理における RFI は、CD86 では 102.3 (陰性)、CD54 では 1404.6 であり、CD54 のみ非常に強い発現亢進が認められた。適用濃度を固定した LPS (1 ng/mL) と適用濃度を振った NM-204 (0.00316~100 µg/mL) との混合曝露では、NM-204 の 31.6 および 100 µg/mL で CD86 の RFI が 150 以上(陽性)となった。NM-204 および LPS はいずれも単独曝露における CD86 の発現亢進はないため、混合曝露による相乗効果と考えられた。一方 CD54 については、NM-204 単独曝露で亢

進作用の認められる 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲で LPS による亢進作用との加算を上回る発現亢進が見られたことから、相乗効果と考えられた。

カーボンナノチューブの評価に際し、まず試験に適用する媒体を検討した。ナノシリカで使用した超純水を用いて超音波処理による分散状態を確認したところ、均一な分散状態を得られなかった。そこで、吸入暴露試験で使用実績のある polysorbate 80 (HX2) で検討したところ、T-MWCNT-7 (分散型) では、ラボミキサーおよび超音波処理により、stock solution (0.1 mg/mL) および working solution (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ともに良好な分散状態が得られた。N-MWCNT-7 (非分散型) についても、stock solution では粒子の凝集がみられたが、分散状態は良好であった。また、polysorbate 80 (HX2) の試験適用可能な添加量を検討した。その結果、0.1 v/v% 以下において、細胞生存率が 90% 以上となったことから、polysorbate 80 (HX2) の最終添加量を 0.1 v/v% とした。以上の検討よりカーボンナノチューブの最高適用濃度を 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈した 8 用量を設定して h-CLAT 試験を実施した。非分散型のカーボンナノチューブである N-MWCNT-7 について、CD86 では発現亢進作用が認められなかつたが、CD54 では 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で発現亢進が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 6 倍(RFI=596.8)となり、陽性となる濃度閾値(EC200 for CD54)は 3.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。分散型では、CD86 について弱い発現亢進作用が認められ陽性となった。CD54 については 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で強い発現亢進が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 10 倍(RFI=1001.3)となつた。分散型の陽性となる濃度閾値(EC150 for CD86, EC200 for CD54)はそれぞれ 8.46

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と出された。

また、産業界との意見交換会では、本研究の背景、目的および得られた研究成果について報告を行い、日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会それぞれより規制に関する最新の情報を紹介いただくとともに、本研究に対する以下のような要望を伺つた。

- ・日本だけでなく、グローバルの規制によって産業界は影響を受けることから、国際的に通用する研究であること
- ・ハザード評価ではなく、リスク評価のための許容値設定に役立つ研究であること
- ・免疫毒性だけでなく、吸入毒性全体への進展も期待
- ・存在状態が影響することから、実際のヒトへの曝露状況を踏まえた安全性評価法であること
- ・動物実験を行うことがほぼ不可能である業界であるため、動物福祉に配慮した安全性評価法であること
- ・ナノ材料に特徴的な多様性を考慮し、効果（科学的正確性）と共に効率性や動物福祉も意識した安全性評価試験の開発
- ・誤った利用、誤った結果解釈に繋がらないよう、試験法の特性を十分に理解した開発と活用目的（スクリーニングなど）の提案

C.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価（大野）

C.2.1. データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で得られた OECD からの試験情報に基づいて作成しており、約 65 項目のデータを収集した。収集・整理された物理化学的性状データシートおよび *in vitro / in vivo*

有害性情報シートは、多変量解析のため、データマイニングを実施した。

C.2.2. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) の階層的クラスタリング解析による類似度の評価

収集した 65 項目の物理化学的性状 (物性) データについての特性解析を実施した結果、類似度は 3 つのグループで示された。また、最初に大きくクラスター化した要因は PCA (主成分分析法) によりコーティングの有無であった。

C.2.3. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) の物性データと抗原提示細胞活性化能の関連性解析

5 種の SiO₂ NPs について OECD の公開データからと分担研究の飯島先生からの DLS 測定データより収集した物性データと *in vitro* 毒性試験データ (h-CLAT 試験法結果) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した。その結果、毒性と関連する変数 (物性項目) が Loadings Plot の横軸から探査可能であることが示唆された。さらに信頼度を加味した解析 (S-plot) を進めた結果、寄与度 0.2 以上、信頼性 0.6 以上の場合の毒性に寄与する変数 (物性項目) として、毒性が強い (NM201) のは、正の相関の高い変数 (物性項目 _AggZaverage_Buffer、 Total impurity:Total non-SiO₂ content including coating and impurities (% w/w)、 Impurity_Al) として、また、毒性が極めて強い (NM204) のは、負の相関の高い変数 (物性項目 _DustinessInhaSD、 DustinessRespSD、 Morphology of aggregates/agglomerates: Angular_low sphericity、 Pdi:Ultra-pure water dispersion、 Aspect ratio) として示唆された。

C.2.4. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) の物性データと *in vivo* 毒性試験データの関連性解析

OECD の公開データから収集した 5 種の SiO₂ NPs の物性データと *in vivo* 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した。鼻部吸入暴露試験結果の毒性に寄与する重要な物性項目とした特徴変数を解析した結果、毒性が弱い (NM200、 NM201、 NM204) は、正の相関の高い変数 (物性項目 _ParticleSize_1、 CoatingYorN(Yes)、 AggZaverage_1、 Agg2Rg1、 CrystallImpurity、 Micropore_Vol、 Sphericity、 PourWaterContent、 MicroporeVol、 MMAD1、 MMAD2) として、また、毒性が強い (NM202、 NM203) は、負の相関の高い変数 (物性項目 _FeretMin(nm)、 Impurity_Ca、 Coating_N(No)、 Agg、 AggMorphology(nm)、 AggIsoElecPointMean(pH)、 AspectRatio、 SAXS_SurfArea(m²/g)) として挙げられた。

C.2.5 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) の物性データと *in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の共通の物性項目の探索

in vitro / *in vivo* 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性の相関を Scatter plot にて探索した結果、相関係数 (R=0.4128) は、正の相関であった。相関はあまり高くはないが、元データを比較してみると信頼性若しくは寄与度は下がるもののが散布図の直線上に近い幾つかの物性について共通物性項目 [Impurity_Al、 Feret Max (nm)、 Micropore surface area (m²/g)、 Pdi:Ultra-pure water dispersion (intra vial study)] として挙げられた。今回、相関が低かった理由の一つに、NM204 の物性の欠損データの多さが影響したと考えられた。

C.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

C.3.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

直径約 10 nm および 50 nm いずれの銀ナノ粒子処理においても CD86 および CD54 の発現の増加が見られた。直径約 10 nm の銀ナノ粒子の EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度), EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) は 127.6 µg/ml, 118.4 µg/ml であり、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は 159.5 µg/ml, 122.9 µg/ml であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方がわずかに低濃度であった。

C.3.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

各種シリカナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現については、ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。全体的な傾向として、未分化 THP-1 の方が遺伝子発現の上昇幅が大きい傾向が見られた。一方、ナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

二酸化チタンナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現については、ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。ナノシリカ粒子と同様にナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

C.3.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞の気-液界面培養 14 日目において緻密な構造が見られるとともに

纖毛の運動が観察された。TEER 測定では 500-600 Ω cm² となり未分化状態での約 70 Ω cm² より上昇していた。

作製された気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養を行った。単培養と気管支上皮細胞との共培養の THP-1 細胞との間で *CD54*, *CD86* の発現や細胞生存率に差は見られなかった。次に、気管支上皮細胞の上部または下部よりシリカナノ粒子 (Sicastar-F) を添加した。気管支上皮細胞の上部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露よりも低いものの *CD54* の発現の増加が見られた。気管支上皮細胞の下部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露のおよそ 2 倍の *CD54* の発現が見られた。

C.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備（高橋）

C.4.1 マウス全身ばく露吸入実験

NM204 の 5 日間反復全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群; 10.3 ± 1.1 mg/m³、高濃度群; 25.6 ± 2.5 mg/m³ (平均値 ± SD) であった。3 回の測定を行った MMAD は低濃度群; 1,439 nm (og: 3.2 ~ 4.2)、高濃度群; 1,468 nm (og: 3.5 ~ 4.0) であった。

エアロゾルの累積分布から、粒子径 100 nm から急激に立ち上がる分布であった。6 時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 616 mg, 1,848 mg であった。6 時間の曝露チャネルの総換気量は 11.7 m³ であることから名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ 52.6 mg/m³, 157.9 mg/m³ と計算される。実際に測定した濃度の平均値から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それ

ぞれ 19.6%、16.2%であった。

実験に供したマウスは定期解剖までの間、いずれも体重推移に異常は認められなかつた。ばく露終了直後(Day0)、4 および 8 週後に定期解剖を行つて試料を採取した。ばく露終了直後の肺重量は、対照群 121.6 ± 4.9 mg、低濃度群 130.8 ± 3.4 mg、高濃度群 138.6 ± 9.2 mg であり、高濃度群では対照群に比較して有意に増加した。

採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。

C.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（石丸）

TiDW の吸入暴露後、4 週および 8 週において肺組織における F4/80、iNOS、CCR2、CD206、Arg1、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 、TLR-4、CD54/ICAM-1、Tim4 の mRNA の発現は対照群と比較して変化はなかつたが、TiDW 暴露後 8 週において、MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が対照群に比較して有意に上昇していた。一方、BALF 細胞における F4/80、MCP-1、iNOS、CCR2、CD206、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、TLR-4、CD54/ICAM-1 および Tim4 mRNA 発現は TiDW 暴露で変化は認められなかつたが、暴露後 4 週での MMP-12 mRNA 発現は対照群に比較して有意に上昇していた。この結果は肺組織における MMP12 mRNA の発現上昇と一致する（令和 2 年度報告済み）。

RAW264.7 細胞への T-CNT および TiDW の添加による変化を観察すると、T-CNT の添加で細胞のサイズが対照細胞に比較して有意に大きくなっていたが、TiDW の添加では T-CNT 処理ほどは大きくなつていなかつた。また、TiDW 暴露によって細胞数あるいは生存率に影響は観察されなかつた。加えて、T-

CNT の添加で上昇していた MMP12 mRNA 発現は TiDW 刺激では上昇しなかつた。

C.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響（渡辺）

C.6.1. BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、曝露量に依存し有意に上昇し、 30 mg/m³ (高用量) 曝露群では感染対照群と比較して約 2 倍まで上昇していた。また、多様な炎症の場において誘導される CCL3 も RSV 感染マウスでは、同様に NW-204 曝露で上昇していた。一方、これらのケモカインは非感染群では NW-204 曝露の有無にかかわらず、何れのマウスでも検出限界以下であった。これらの結果より、NW-204 が RSV 感染肺炎の増悪因子であることが示唆された。

前年度までの班研究において、CD54 (ICAM-1) がナノシリカ曝露による影響指標の一つであることが示されてきている。細胞表面に発現した CD54 分子は、その発現量に比例して可溶性 CD54 (sCD54) が産生されることが知られているため、ELISA 法で BALF 中の定量を行つた。sCD54 量は、RSV 感染により約 3 倍増加したが、NW-204 曝露による影響は 10~20%程度の上乗せ効果に留まつた。

C.6.2. 肺の病理組織学評価結果

HE 染色およびマッソントリクロム染色 プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。RSV 感染のみ (0 mg/m³ 曝露) では、葉における偏りは少なく、動脈と細気管支周囲にリンパ球の浸潤など軽度の間質性の肺炎が認められた。NW-204 低用

量 (10 mg/m^3) 曝露/RSV 感染群では、これらの特徴に加えて局所的なマクロファージの集束が散見され、さらに胸膜下への浸潤も見られた。高用量曝露ではさらに炎症が強まり、肺胞壁の肥厚や胸膜下へのリンパ球とマクロファージの浸潤が認められた。一方、非感染マウスでは、高用量曝露で部分的に細気管支周囲のリンパ球浸潤はあったが、マクロファージの集束などは全く認められなかった。このように、BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果を反映して、NW-204 曝露は RSV 感染肺炎を増悪化することが明らかとなつた。

D. 考察

D.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成（足利）

これまで本研究では、様々なナノマテリアルが抗原提示細胞株である THP-1 細胞を活性化することを見出したが、そのメカニズムを解明するために、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質との混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質である DNCB は NM-204 による THP-1 の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質である LPS は NM-204 による THP-1 の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなった。以上のことから、ナノマテリアル NM-204 による THP-1 の活性化は、皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによる可能性が考えられた。今後はこれら活性化物質による THP-1 細胞のインフラマソームや NF-kB の活性化を解析することで、ナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明する予定である。

今回カーボンナノチューブが THP-1 細胞を活性化することを新たに見出した。分散型の活性化能が高かったのは、細胞への取り込みやすさと関連があると考えた。今後性質の異なるカーボンナノチューブについて h-CLAT 試験による評価を行い、物性と活性化の関連などの解析を行う。

研究分担者の渡辺は、本年度ナノマテリアルの短期全身曝露による感染性免疫系への影響を評価するため、ナノシリカNW-204 の複数回の *in vivo* 吸入曝露試験による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。その結果、RSV感染マウスのマウスでは、RSV肺炎の代表的なマーカーである CCL5 (RANTES) と炎症性ケモカイン CCL3 (MIP-1 α) レベルは、NW-204曝露により有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、NW-204は全く影響が認められなかつた。以上より、今回のNW-204の吸入曝露は、正常マウスにおいて単独では炎症を惹起するような免疫刺激にならず、RSV感染により、細胞に取り込まれていたNW-204が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類がRSV感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。

一方我々の分担研究においては、グラム陰性菌由来のLPSとナノシリカNM-204と同時曝露による*in vitro*抗原提示細胞活性化について相乗効果が認められた。先行研究においても、THP-1細胞にナノシリカまたはLPSを暴露したTHP-1細胞の活性化が評価されており、ナノシリカそのものにはNF-kB活性化能はなかつたが、LPSによるNF-kB活性化に対し、ナノシリカはプライミング効果を示した¹⁾。したがって、TRL (Toll-

like receptor)を介したLPSやウイルスRNAなどのPAMPs (pathogen-associated molecular patterns)による抗原提示細胞の活性化に対し、ナノシリカは異なるメカニズムにより相乗的に働く可能性が考えられ、本研究班の知見はそれを裏付けるものと考える。

- 1) M. G. Bianch et al., Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica, Nanoparticles Differentially Affect Cell Responses to LPS in Human Macrophages, *Nanomaterials* 2020, 10, 1395; doi:10.3390/nano10071395

また、産業界との意見交換会において、科学的正確性があり、動物福祉にも配慮した、NMの国際的な安全性評価方法の開発が強く望まれていること、さらにNMのみならず化学物質の吸入毒性を評価する試験法や、生体レベルでのリスク評価を可能にする試験法開発への期待も大きいことが伺えた。難易度が高い課題も多いが、NMの社会実装を行っている産業界からの貴重な意見として、本研究班の今後の研究に活用していくべきと考える。

D.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価（大野）

物性データと抗原提示細胞活性化能 (h-CLAT 試験法結果) の関連性解析の結果から、毒性の極めて強い NM204 の物性は、巻き上がり度が高いことが示唆された。一方で、毒性の強い NM201 は、他の検体よりも二次粒子径としての凝集性が高く、また全体の不純物の含有率が多いが、不純物としてのアルミニウムが特徴的に挙がってきている。これは恐らくコーティング材由来のアルミニウムと推察された。従って、NM201 の毒性の強さに由来する物性は、凝集のし易さ

とコーティング材の性質が影響しているものと考えられた。

in vivo 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性解析の結果から、毒性の弱い (NM200, NM201, NM204) は、一次粒子径が大きく、コーティングされており、二次凝集性が高い、巻き上がりにくい物性の性質を有することが示唆された。一方で、毒性の強い (NM202, NM203) は、フェレット径は大きく、不純物のカルシウムの含有 (NM200, NM201, NM203 は欠損値)、コーティングが無く、高いアスペクト比と表面積が大きい物性の性質を有する事が示唆された。また、物性のみのクラスタリングで最初に大きくクラスター化した要因もコーティングの有無であったいることから、クラスター化の最初の類似度と *in vivo* の毒性結果との関連性について反映している可能性が示唆された。

in vitro / in vivo 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性項目の探索では、相関が低かった理由の一つに、NM204 の物性の欠損データが多いことが影響したと考えられたことから、欠損データを作らないことや解析では補っていくことの検討が必要であると考える。

D.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

D.3.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

EC150 (CD86 発現が 150% を超える濃度) の比較において、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の 127.6 µg/ml に対し、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は 159.5 µg/ml であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方が、抗原提示細胞活性化能がわずかに高い可能性が示された。

この要因として、粒子径による取り込み挙動の変化と溶出銀イオン濃度の影響が考えられる。銀ナノ粒子からは銀イオンの溶出が見られ、溶出率は直径約 50 nm の銀ナノ粒子の 0.1%に対し、直径約 10 nm の銀ナノ粒子では 2.0%と高くなっていた。銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとしても作用していることが示唆された。

D.3.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子処理において、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の新たな指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、沈降法により調製された粒子 (NM-204, NM200, NM201) と比較して、高熱法 (NM-203, NM-202) およびストーバー法 (Sicastar-F) により調製された粒子の方が *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、粒子調製法による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。同一調製法においては、流体力学径が小さいものほど *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、抗原提示細胞の活性化は粒子の細胞への取り込みに依存している可能性が示唆された。一方、分化 THP-1 においては、流体力学径の影響はほとんど見られず、分化による貪食能が高まったためと考えられた。高熱法により調製されたナノ粒子において *CD54* が発現亢進したのに対し、*MMP-12* の発現はほとんど変化せず、*CD54* と *MMP-12* の発現の乖離が見られた。今後、この原因や毒性評価における意義について検討を進める。

二酸化チタンナノ粒子処理においても、

未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、ルチル型粒子 (MT-150A, MT-500B) と比較して、アナターゼ型粒子 (AMT-100, AMT-600, TKP-102) の方が *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、結晶型による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。ルチル型での比較においては、流体力学径が小さいものほど *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、シリカナノ粒子と同様に細胞への取り込みの依存が考えられた。未分化・分化 THP-1 いずれにおいても、ルチル型の中で針状結晶の TiDW が *CD54* と *MMP-12* の高発現を誘導し、形状による抗原提示細胞活性化能の違いも示唆された。

D.3.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞との共培養において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進がみられた。気管支上皮細胞を透過した Sicastar-F もしくは Sicastar-F を曝露された気管支上皮細胞からの分泌物により THP-1 細胞の *CD54* 発現量が増加したことが示唆された。気管支上皮細胞の下部から直接曝露した際の *CD54* の発現量は、THP-1 単培養時の 2 倍ほどであった。気管支上皮細胞からの分泌物が抗原提示細胞の活性化能 (*CD54* 発現量) に影響を及ぼすことが示唆され、気管支上皮細胞の分泌する液性因子の影響と考えられる。本共培養系が、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との細胞間クロストークを含めた評価系となりうる可能性が示された。

D.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備（高橋）

粒子状物質の吸入において、粒径は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルにばく露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入ばく露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離纖維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入ばく露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためにには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

本分担研究で用いたナノシリカ NM204 は、分散性が良好であり Taquann 法および Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 により容易にエアロゾル化することが可能であった。NM204 のエアロゾル特性として、MMAD は低濃度群、高濃度群とともに約 1,500 nm (1.5 μm) であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < 3 μm を達成してい

る。エアロゾルの粒径分布の指標となる σ_{g} は 3.2~4.2 と TG413 で推奨される 1~3 と比較すると、若干広い範囲の粒度分布である。エアロゾルの累積分布において明らかであるように、NM204 エアロゾルは、累積粒子径が 100 nm から急激に立ち上がる分布であるため、MMAD がこのような値を示すと考えられる。一方、エアロゾル化効率は 20%程度であり、先行研究にて使用した多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 (三井) の約 60%から比較すると 1/3 程度の値である。CPC の濃度推移を比較すると、NM204 はカートリッジからエアロゾルが噴射された直後の CPC カウントの立ち上がりが MWNT-7 に比較して緩やかである。濃度低下は同様であることから、沈降速度は同じであるが、カートリッジから噴射された検体のうち、サブチャンバーでのトラップされる量が多いのかもしれない。

NM204 ばく露によるマウスは、体重推移においては影響が認められていない。肺重量に関しては、ばく露終了直後である Day0 において、低濃度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4 週後及び 8 週後では有意な変化は認められなかった。NM204 の肺負荷量は 5 日間の連続ばく露で次第に増加するため、その影響と考えられるが、ばく露終了後は比較的速やかに肺から排泄されるのかもしれない。

今後、サンプリングした肺の病理組織と肺負荷量測定を行い、NM204 の影響を明らかにする計画である。

D.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（石丸）

TiDW 吸入暴露後 4 週にて肺組織ならびに BALF 細胞にて MMP12 mRNA 発現が上

昇し、暴露後 8 週の肺組織で MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が上昇したことから、TiDW が肺内で暴露されると、肺胞マクロファージの MMP12 を介したが活性化が誘導され、その後炎症性変化が肺組織に広がっていった可能性が考えられる。In vitro では TiDW のマクロファージへの直接の作用を確認すると、T-CNT で見られたような MMP12 発現上昇は確認されなかったことから、ナノマテリアルの形状や性状によってマクロファージの動態は大きく異なっていることが示唆された。

なお、本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかった。

D.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響（渡辺）

先行研究では、Taquann 全身曝露吸入装置での MWNT-7 複数回の吸入曝露により、カーボンナノチューブが RSV 感染最盛期での肺炎を増悪化することを示してきた。そこで、本研究ではナノシリカ NM-204 について、同様に RSV 感染 5 日後の最盛期における病態への影響を評価した。RSV 感染マウスの BALF では、RSV 肺炎の代表的なマーカーである CCL5 (RANTES)と炎症性ケモカイン CCL3 (MIP-1 α) レベルは、NW-204 曝露によりカーボンナノチューブと同様に有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、カーボンナノチューブ曝露では CCL3 の上昇が見られていたのに対して、NW-204 は全く影響が認められなかつた。同様の結果は、sCD54 の曝露でも得られた。これらの結果より、今回の NW-204 の吸入曝露は、正常マウスにおいて炎症を惹起するような免疫刺激にならず、その後の RSV 感染により、細胞に取り込ま

れていた NW-204 が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。

肺の病理組織学的な検討では、NW-204 曝露のみではリンパ球浸潤などの炎症像はあまり認められず、サイトカイン・ケモカインレベルの結果を良く反映するものであった。そして NW-204 曝露 / RSV 感染群では、ナノシリカ粒子こそ確認されなかつたがマクロファージの集束が亢進しており、これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類が RSV 感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。特に胸膜下への細胞浸潤は RSV 感染のみ、あるいは NW-204 曝露のみではほとんど観察されなかつた。仮にナノシリカ粒子を貪食した細胞が RSV 感染により浸潤しているのであれば、胸膜へのナノシリカの集積に繋がり、中皮腫のようなより重篤な疾患へのリスクを高める可能性も否定的できない。今後は RSV 感染後の期間を延長するなどの検証が必要と思われる。

E. 結論

E.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成（足利）

代表的な皮膚感作性物質 DNCB とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露し、活性化の指標である CD86 および CD54 の発現量を測定したところ、DNCB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、THP-1 細胞の活性化について相乗効果が認められた。以上より、ナノマテリアルによる活性化は皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なる

メカニズムによるものと考えられた。今後こうしたナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明するため、飯島先生とインフラマソーム活性化を検討する予定である。

さらに新たなナノマテリアルとしてカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かった。今後カーボンナノチューブについて THP-1 細胞の活性化能を検討する予定である。

日本化粧品工業連合会および日本化学工業協会と意見交換会を行い、本研究について理解を深めていただくとともに、産業界からの様々な要望を伺った。本研究は NM の規制の観点から産業界と連携すべきと考えており、次年度も同様の意見交換会を実施する予定である。

E.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価(大野)

5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂ NPs)について、公開された文献や本研究班の分担研究者の測定値などからの約 65 項目の物性および *in vitro / in vitro* 有害性情報を収集・整理した。*in vitro* 有害性情報は本研究班の足利代表者研究者が実施した h-CLAT 法による 5 種の SiO₂ NPs の THP-1 細胞を用いた細胞生存率、CD86 および CD54 発現に与える影響について、*in vitro* 有害性情報は、OECD の公開データより鼻部吸入暴露試験_気管内投与試験結果について纏めた。これらの物性および *in vitro/in vivo* の有害性情報の収集データについては、解析用データに整理・データマイニング後、収集した物性についての特性解析や *in vitro/in vivo* 有害性

データとの関連性解析により幾つかの物性項目の特徴を見出した。今後は *in vitro/in vivo* 間の有害性データに共通な物性との相関解析の算出方法について改善し進めていく予定である。

E.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明(飯島)

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。現在、ウェスタンブロッティングを用いて、毒性発現における細胞内経路の解析も進めている。

従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の CD86, CD54, MMP-12 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。

E.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備(高橋)

NM204 の高分散乾燥検体をもちいて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、低濃度群； $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに $1.5 \mu\text{m}$ 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。肺重量に関して、5 日間ばく露終了直後の肺では、高濃度群で有意な増加がみられたが、4 及び 8 週後では変化はみとめられなかった。

E.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（石丸）

マクロファージのMMP12を起点と活性化機構がナノマテリアルの毒性評価法の確立に重要な位置を占めている可能性が考えられ、*in vitro*および*in vivo*の評価系を総合した毒性試験が必要であると考える。

E.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響（渡辺）

1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NW-204 の Taquann 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化した。
2. NW-204 曝露のみでは、肺での炎症はあまり認められなかった。
3. 肺炎増悪化の指標に、ケモカイン CCL3、CCL5 および sCD54 が利用できる可能性が示された。
4. NW-204 曝露/RSV 感染により、集束化した肺胞マクロファージ類が胸膜下まで局在化していることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M: Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2021;125, 105019.
2. Nishida H, Otake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H: In chemico sequential testing strategy for

assessing the photoallergic potential, *Toxicology in Vitro*, 2021; 77, 105245

3. Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, Ashikaga T: Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in *in Vitro* Methods for Skin Sensitization, *AATEX*, 2021; 26(1), 9-18.
4. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a Threshold of Toxicological Concern Concept for Skin Sensitization by *in Vitro/in Silico* Approaches. *日本香粧品学会誌* 2021;45(4):331-5.
5. Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175, doi.:10.2131/fts.8.169
6. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873.
7. Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1-μm aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass

- spectrometry imaging, *Int J Pharm.* 2021;595:120241.
doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241.
8. Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO. Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr.* 2021, 69(3):238-246.
 9. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fosobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14943.
 10. Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, Ishimaru N, Kamioka H. Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp 1a1 signaling axis. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14927
 11. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly MC, Awasthi P, Takada K, Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8+ T cells in the cortex independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904. doi:10.1084/jem.20201904.
 12. Hashiguchi S, Miyauchi A, Komemoto K, Ueda T, Tokuda K, Hirose A, Yoshida H, Akashi T, Kurokawa M, Watanabe W. Effects of intranasal administration of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) suspension on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *Fundam Toxicol Sci.* 2021:v, 215-220.
 13. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S. A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol Sci.* 2022, 9(1),17-21, doi.org/10.2131/fts.9.17
 14. Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T. PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immunol.* 2022;23(3):399-410. doi: 10.1038/s41590-021-01125-7.
 15. Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa. *Inflammation.* 2022;45(3), 1348-1361. doi: 10.1007/s10753-022-01624-1
 16. Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T. von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation. *J Cell Physiol.* 2022, 237(3):1964-1979. doi: 10.1002/jcp.30667
 17. Ohno Y. Okiyama A, Hirose K, Fukuhara. The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 2022, 441, 115974

G.2. 学会発表

1. 新垣理恵子, 清水朱里, 佐藤真美, 僥宏

- 彰, 常松貴明, 石丸直澄 唾液腺における常在型自然リンパ球の同定とシェーグレン症候群病態への関与 第110回日本病理学会学術集会 (2021.4.23, 東京)
2. 佐藤真美, 牛尾綾, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 第 110 回日本病理学会学術集会 (2021.4.23, 東京)
 3. 高橋祐次: 粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14, On line)
 4. 石丸直澄 口腔科学を牽引する基礎研究の展望 日本補綴歯科学会 第 130 回記念学術大会シンポジウム (2021.6.20, On line)
 5. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9, 神戸)
 6. 石丸直澄, 新垣理恵子, 常松貴明, 高橋祐次, 菅野純 ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9, 神戸)
 7. 山本 栄一、高橋祐次: 吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9, 神戸)
 8. 田邊郁也, 石川晋吉, 石森かな江, 橋爪恒夫, 善本隆之, 足利太可雄: 呼吸器特異的な免疫応答を再現した *in vitro* 呼吸器感作性試験の開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9, 神戸)
 9. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-9, 神戸)
 10. Ashikaga T: Skin Sensitization Testing Strategy for Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11)(2021.8.24, On line)
 11. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K: Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA, On line)
 12. Fukuhara K, Ohno A : C-Methylated fisetins with strong antioxidative activities, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA, On line)
 13. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31, On line)
 14. 相場節也, 木村裕, 足利太可雄, 小島肇: Multi-ImmunoToxicity Assay とガイダンス化状況 , 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7, On line)
 15. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7, On Line)
 16. 佐藤真美, 牛尾綾, 福田一稀, 俵宏彰, 大塚邦紘, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の病態探索 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)

17. 田村海, 新垣理恵子, 太田康, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いたドライノーズ病態の解析 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)
18. 俵宏彰, 新垣理恵子, 大塚邦紘, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いたM3PAM を用いた治療効果とその作用機序 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)
19. Fukuhara K, Ohno A : Potent radical-scavenging activities of C-methyl fisetins、第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30-10.2, 横浜)
20. 石丸直澄 基礎歯学研究の進化と展望 第 63 回歯科基礎医学会先端歯学国際教育ネットワークシンポジウム (2022.10.9, On line)
21. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, , Fukuhara K : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (ハイブリッド開催) (2021.11.1-2, 横須賀)
22. Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited (2021.11.2, On line)
23. 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 HPV 陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明 第 57 回口腔組織培養学会学術大会 (2021.11.6, On line)
24. 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, David Basketter, Chantra Eskes, Sebastian Hoffmann, David M. Lehmann, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 鈴木 将, 宮澤正明, 小島 肇: 皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA) の Validation 研究, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会(2021.11.11-13, 沖縄)
25. 足利太可雄: 非動物実験アプローチによる皮膚感作のリスク評価と TTC, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.13, 沖縄)
26. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
27. 鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 未分化および分化THP-1細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化および MMP-12遺伝子発現の解析, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13, 沖縄)
28. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内への影響 -OECD ガイドライン No.497を中心-, 日本安全性試験受託研究機関協議会 第 3 回定期総会及び講演会(2021.11.19)
29. Fukuhara K, Mori K, Okiyama Y, Ohno A, Misawa T, Mizuno M, Demizu Y, Shibanuma M. Rationally designed peptide modulators of A β toxicity in Alzheimer's disease, AIMECS2021_13thAFMC International Medicinal Chemistry Symposium

- (2021.11.29-12.2, On line)
30. Ashikaga T: In vitro method development for evaluating inhalation toxicity of nanomaterials, Second expert workshop for Applicability of Test Guideline 442D in vitro skin sensitization for nanomaterials (2021. 12. 3)
31. Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
32. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA sequencing reveals accumulation of CD4 and CD8 T cells with unique phenotypes in salivary glands of Sjögren's syndrome model mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
33. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)
34. Iijima K, Nishida A, Suzuo M, Miura Y, Ashikaga T, Ohno A: Analysis of Antigen-presenting Cell Activation by Nanomaterials Using Monocytic Cell Line, APA NANOFORUM-2022 (2022.2.24-26) (Invited talk)
35. 福原 潔、森 一憲、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子、アミロイド β の神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発、日本農芸化学会 2022 年度大会 (2022.3.15-18, 京都)
36. 足利太可雄: THP-1 細胞の活性化を指標にしたナノマテリアルの免疫毒性評価の試み, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.26, On line)
37. 大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題 : in silico 手法によるナノマテリアル有害性評価へのアプローチ、日本薬学会第 142 年会シンポジウム (オンライン開催) (2022. 3. 26, On line)
38. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発, 日本薬学会第 142 年会(2022.3.27, On line)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルのTHP-1細胞への影響評価に関する研究

研究分担者 足利太可雄
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

研究要旨

本分担研究は、様々な特徴を有する各種NMの抗原提示細胞活性化能の評価を行うことでin vivo試験や物性値の測定および情報収集から得られた知見と統合データセットを確立することを目的としている。

昨年度二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）がヒト単球細胞株THP-1のCD54発現を著しく亢進することを見出ましたが、本年度はTHP-1細胞の活性化を指標とするOECD皮膚感作性試験テストガイドライン442E(h-CLAT)を用いて、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質についてナノシリカNM-204の混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質であるDNCBはNM-204によるTHP-1細胞の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質であるLPSはNM-204によるTHP-1細胞の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなった。さらに、カーボンナノチューブであるT-MWCNT-7もTHP-1のCD54発現を強く亢進することを明らかとした。

A. 研究目的

本研究は、短期吸入曝露された各種NMの免疫系に与える影響についてin vitro/in vivo試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、in vitro試験法の確立と将来的なOECDガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的としている。そのため本分担研究では、様々な特徴を有する各種NMの抗原提示細胞活性化能の評価を行うことでin vivo試験や物性値の測定および情報収集から得られた情報との統合データセットを確立する。

B. 研究方法

前年度評価対象物質とした二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5種のうち、THP-1細胞におけるCD54の発現誘導能が最も高かったNM-204を用いて、前年度結果の再現性およびNM-204と他の活性化物質との混合曝露について検討を行った。活性化物質として、代表的な皮膚感作性物質である2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB)および代表的な発熱性物質であるLipopolysaccharide(LPS)を用いた。

更に、新たなNMとして分散性の異なるカーボンナノチューブ（分散型：T-

MWCNT-7、非分散型：N-MWCNT-7)を用いて、抗原提示細胞活性化能の評価を行った。

抗原提示細胞活性化能の評価方法は、前年度同様 THP-1 細胞の活性化を指標とする in vitro 皮膚感作性試験法である h-CLAT(OECD TG442E)に準拠して実施し、陽性・陰性の判断だけでなく強度の指標として発現の濃度閾値(EC150 for CD86 と EC200 for CD54)を求めた。

h-CLAT試験は、被験物質適用のための懸濁液を調製し、以下のように行った。24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1細胞懸濁液500 mlおよび各被験物質の分散液500 mlを添加し、CO₂インキュベーター内で 24時間静置した。被験物質の曝露濃度は予備試験の結果から最高濃度を1000 μg/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釀して合計8濃度を設定した。暴露後のTHP-1細胞を10% BSA 含有リン酸緩衝液(PBS)(FB)で洗浄後、0.01%グロブリン、10% BSA含有PBSにて15 分間ブロッキングした。96 ウェルプレートの各ウェルに分注した細胞をそれぞれ FITC修飾された抗CD54抗体、抗CD86抗体およびIgGで30分間処理した後、FBで細胞を洗浄、ヨウ化プロピジウムを添加した。フローサイトメトリーを用いてFL-1チャネルおよびFL2チャネルの強度を測定し、CD54、CD86の発現を培地処理群 (control)に対する相対蛍光強度(RFI)として求めるとともに、細胞生存率を算出した。独立した試験を3回行った。陽性判定基準は、OECDテストガイドラインに従い、3回の試験のうち2回以上の試験で、1濃度でもCD86 の発現量(RFI)が150%以上、またはCD54の発現量(RFI)が200%以上になった場合とした。

(倫理面への配慮)

全て in vitro 試験であり、倫理上の問題はないと考える。

C. 研究結果

ナノシリカ NM-204 単独の h-CLAT 試験を実施した結果、CD86 の発現誘導は認められず、CD54 については、10～100 μg/mL の濃度で濃度依存的に強い発現誘導が認められ、前年度の結果の再現性が得られた。結果を図 1 に示す。

次に DNCB の適用濃度を固定(4 μg/mL)し、NM-204 と混合曝露(適用濃度:0.00316～100 μg/mL)した。CD86 の RFI は、294.3～316.8 となり、DNCB 単独の RFI である 318.4 ± 30.1 (n=3) と同程度であったことから、混合曝露により相加・相乗効果はない判断された。CD54 においては、混合曝露の場合の RFI は 462.8～518.3 と DNCB 単独曝露の場合の RFI である 475.9 ± 176.3 (n=3) と同程度の値を示し、10～100 μg/mL の NM-204 単独曝露で認められた RFI の上昇は認められず、DNCB との混合曝露により抑制されていた。結果を図 2 に示す。

発熱性物質 LPS(1 ng/mL)単独処理における RFI は、CD86 では 102.3 (陰性)、CD54 では 1404.6 であり、CD54のみ非常に強い発現亢進が認められた。適用濃度を固定した LPS(1 ng/mL)と適用濃度を振った NM-204(0.00316～100 μg/mL)との混合曝露では、NM-204 の 31.6 および 100 μg/mL で CD86 の RFI が 150 以上(陽性)となった。NM-204 および LPS はいずれも単独曝露における CD86 の発現亢進はないため、混合曝露による相乗効果と考えられた。一方 CD54 については、NM-204 単独曝露で亢進作用の認められる 10

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲で LPS による亢進作用との加算を上回る発現亢進が見られたことから、相乗効果と考えられた。結果を図 3 に示す。さらに、LPS と NM-204 の混合曝露の RFI 値から LPS 単独曝露の RFI の値を差し引いた結果について、図 4 a (CD86), と b (CD54) に示す。

カーボンナノチューブの評価に際し、まず試験に適用する媒体を検討した。ナノシリカで使用した超純水を用いて超音波処理による分散状態を確認したところ、均一な分散状態を得られなかった。そこで、吸入暴露試験で使用実績のある polysorbate 80 (HX2) で検討したところ、T-MWCNT-7(分散型) では、ラボミキサーおよび超音波処理により、stock solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および working solution (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ともに良好な分散状態が得られた。N-MWCNT-7(非分散型) についても、stock solution では粒子の凝集がみられたが、分散状態は良好であった。また、polysorbate 80 (HX2) の試験適用可能な添加量を検討した。その結果、0.1 v/v% 以下において、細胞生存率が 90% 以上となったことから、polysorbate 80 (HX2) の最終添加量を 0.1 v/v% とした。以上の検討よりカーボンナノチューブの最高適用濃度を 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈した 8 用量を設定して h-CLAT 試験を実施した。非分散型のカーボンナノチューブである N-MWCNT-7 について、CD86 では発現亢進作用が認められなかつたが、CD54 では 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で発現亢進が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 6 倍(RFI=596.8)となり、陽性となる濃度閾値(EC200 for CD54)は 3.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。分散型では、CD86 について弱い発現亢進作用が認められ陽

性となった。CD54 については 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で強い発現亢進が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 10 倍(RFI=1001.3)となつた。分散型の陽性となる濃度閾値(EC150 for CD86, EC200 for CD54)はそれぞれ 8.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と出された。非分散型と分散型それぞれの結果を図 5 と図 6 に示す。

D. 考察

これまで本研究では、様々なナノマテリアルが抗原提示細胞株である THP-1 細胞を活性化することを見出しがたが、そのメカニズムを解明するために、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質との混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質である DNCB は NM-204 による THP-1 の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質である LPS は NM-204 による THP-1 の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなつた。以上のことから、ナノマテリアル NM-204 による THP-1 の活性化は、皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによる可能性が考えられた。今後はこれら活性化物質による THP-1 細胞のインフラマソームや NF- κ B の活性化を解析することで、ナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明する予定である。

今回カーボンナノチューブが THP-1 細胞を活性化することを新たに見出した。分散型の活性化能が高かつたのは、細胞への取り込みやすさと関連があると考えた。今後性質の異なるカーボンナノチューブについて h-CLAT 試験による評価を行い、物性と活性化の関連などの解析を行う。

研究分担者の渡辺は、本年度ナノマテリアルの短期全身曝露による感染性免疫系への影響を評価するため、ナノシリカNW-204の複数回のin vivo吸入曝露試験によるrespiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。その結果、RSV感染マウスのマウスでは、RSV肺炎の代表的なマーカーであるCCL5 (RANTES) と炎症性ケモカインCCL3 (MIP-1 α)レベルは、NW-204曝露により有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、NW-204は全く影響が認められなかつた。以上より、今回のNW-204の吸入曝露は、正常マウスにおいて単独では炎症を惹起するような免疫刺激にならず、RSV感染により、細胞に取り込まれていたNW-204が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類がRSV感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。

一方我々の分担研究においては、グラム陰性菌由来のLPSとナノシリカNM-204と同時曝露によるin vitro抗原提示細胞活性化について相乗効果が認められた。先行研究においても、THP-1細胞にナノシリカまたはLPSを暴露したTHP-1細胞の活性化が評価されており、ナノシリカそのものにはNF-kB活性化能はなかつたが、LPSによるNF-kB活性化に対し、ナノシリカはプライミング効果を示した¹⁾。したがって、TRL (Toll-like receptor)を介したLPSやウイルスRNAなどのPAMPs (pathogen-associated molecular patterns)による抗原提示細胞の活性化に対し、ナノシリカは異なるメカニズムにより相乗的に働く可能性が考えられ、本研究班の知見はそれを裏付けるものと考える。

- 1) M. G. Bianch et al., Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica, Nanoparticles Differentially Affect Cell Responses to LPS in Human Macrophages, *Nanomaterials* 2020, 10, 1395; doi:10.3390/nano10071395

E. 結論

代表的な皮膚感作性物質 DNCB とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露し、活性化の指標である CD86 および CD54 の発現量を測定したところ、DCNB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、THP-1 細胞の活性化について相乗効果が認められた。以上より、ナノマテリアルによる活性化は皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによるものと考えられた。今後こうしたナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明するために、インフラマソーム活性化を検討する予定である。

さらに新たなナノマテリアルとしてカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かつた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M: Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost, *Regulatory*

- Toxicology and Pharmacology, 2021;125, 105019.
2. Nishida H, Otake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H: In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential, Toxicology in Vitro, 2021; 77, 105245
 3. Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, Ashikaga T: Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in *in Vitro* Methods for Skin Sensitization, AATEX, 2021; 26(1), 9-18.
 4. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a Threshold of Toxicological Concern Concept for Skin Sensitization by *in Vitro/in Silico* Approaches. 日本香粧品学会誌. 2021;45(4):331-5.
 5. 足利太可雄: *In vitro/in silico* 試験による皮膚感作性の毒性学的懸念の閾値(TTC)コンセプトの確立. Cosmetology, 2021;29, 62-66.
- F.2. 学会発表
1. 田邊郁也, 石川晋吉, 石森かな江, 橋爪恒夫, 善本隆之, 足利太可雄: 呼吸器特異的な免疫応答を再現した *in vitro* 呼吸器感作性試験の開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9)
 2. Ashikaga T: Skin Sensitization Testing Strategy for Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11)(2021.8.24)
 3. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31)
 4. 相場節也, 木村裕, 足利太可雄, 小島肇: Multi-ImmunoToxicity Assay とガイド化状況, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
 5. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
 6. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
 7. 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, David Basketter, Chantra Eskes, Sebastian Hoffmann, David M. Lehmann, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 鈴木 将, 宮澤正明, 小島 肇: 皮膚感作性試験代替法 EpiSensA の Validation 研究, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会(2021.11.11-13)
 8. 足利太可雄: 非動物実験アプローチによる皮膚感作のリスク評価と TTC, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会(2021.11.13)
 9. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内への影響 -OECD ガイドライン No.497 を中心に-, 日本安全性試験受託研究機関協議会 第 3 回定期総会及び講演会(2021.11.19)
 10. Ashikaga T: *In vitro* method development for evaluating inhalation toxicity of nanomaterials, Second expert workshop for Applicability of Test Guideline 442D

in vitro skin sensitization for
nanomaterials (2021. 12. 3)

11. 足利太可雄: THP-1 細胞の活性化を指標にしたナノマテリアルの免疫毒性評価の試み, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.26)
12. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による *in silico* 予測モデルの開発, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.27)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

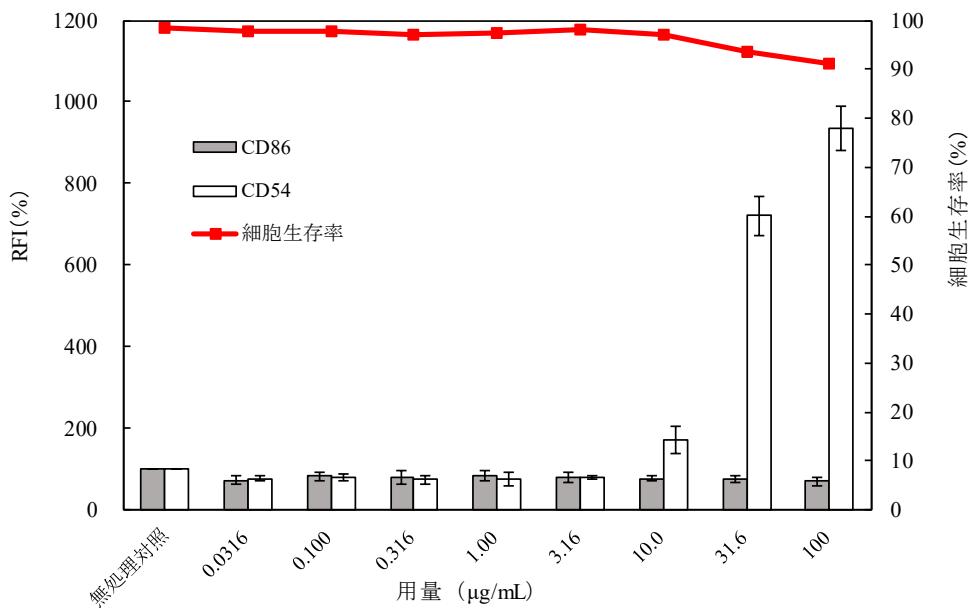


図1 NM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

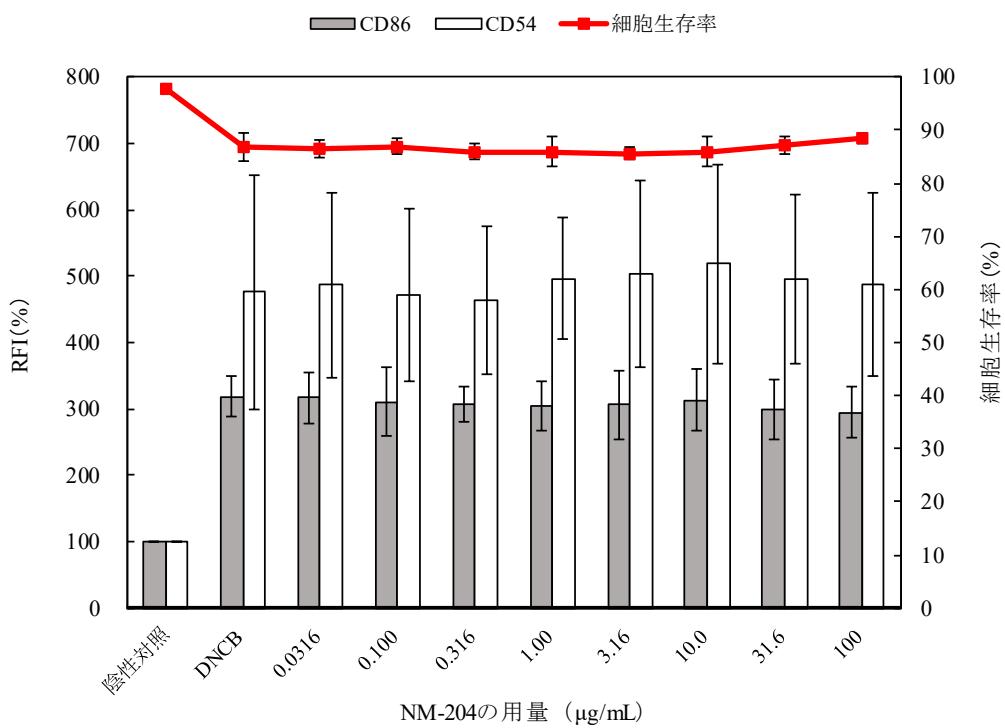


図2 DNCB (4 $\mu\text{g/mL}$)存在下でのNM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

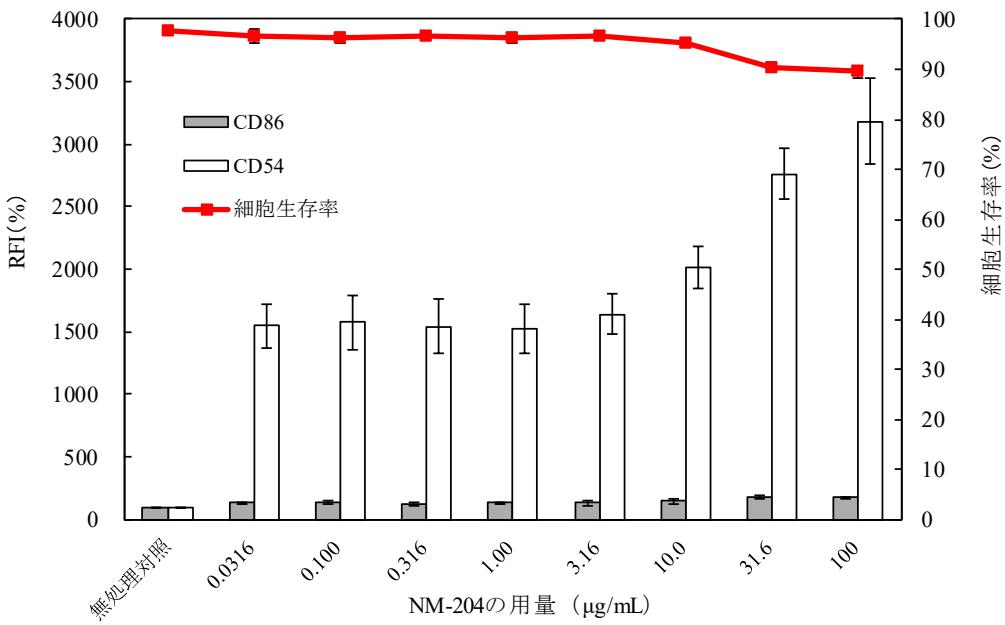


図3 LPS (1ng/mL)存在下でのNM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

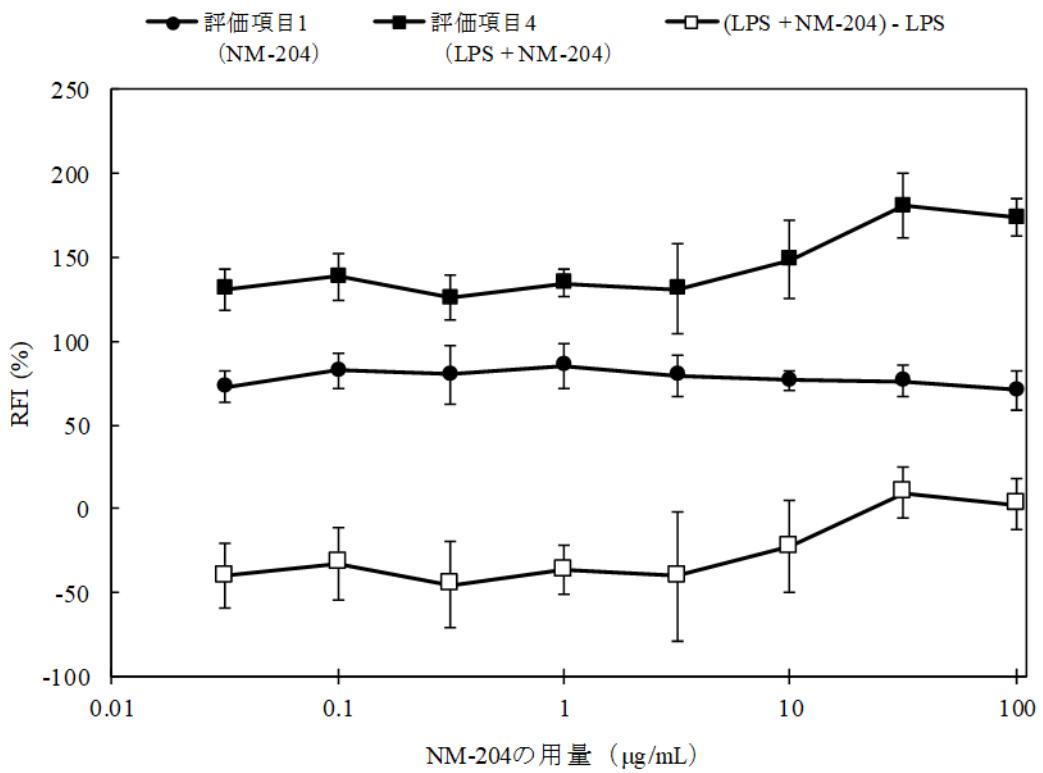


図4-a LPSとNM-204混合曝露のRFI (CD86)とNM-204単独のRFI (CD86)の差

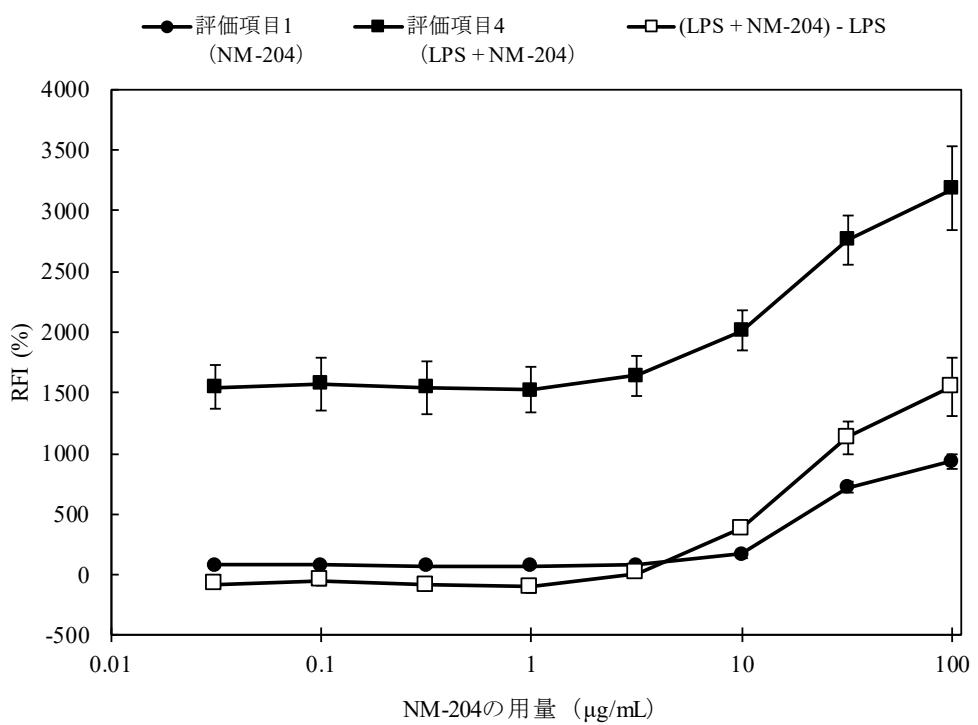


図4-b LPSとNM-204混合曝露のRFI (CD54)とNM-204単独のRFI (CD54)の差

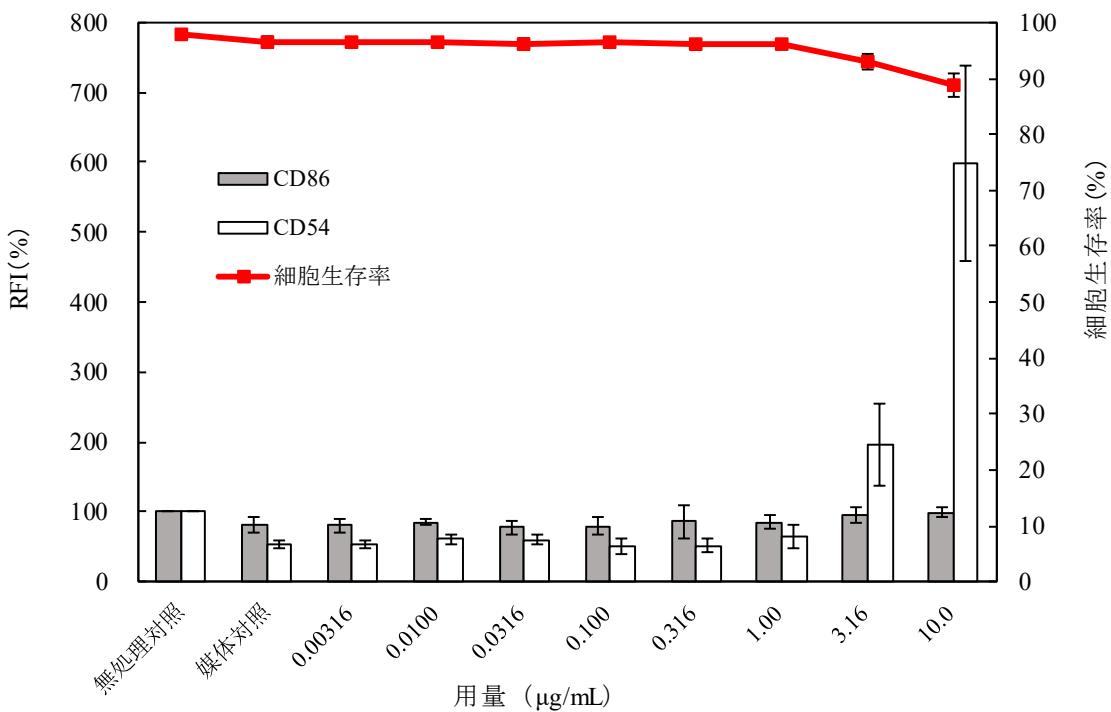


図5 N-MWCNT-7 (非分散型) のRFI及び細胞生存率 (n=3)

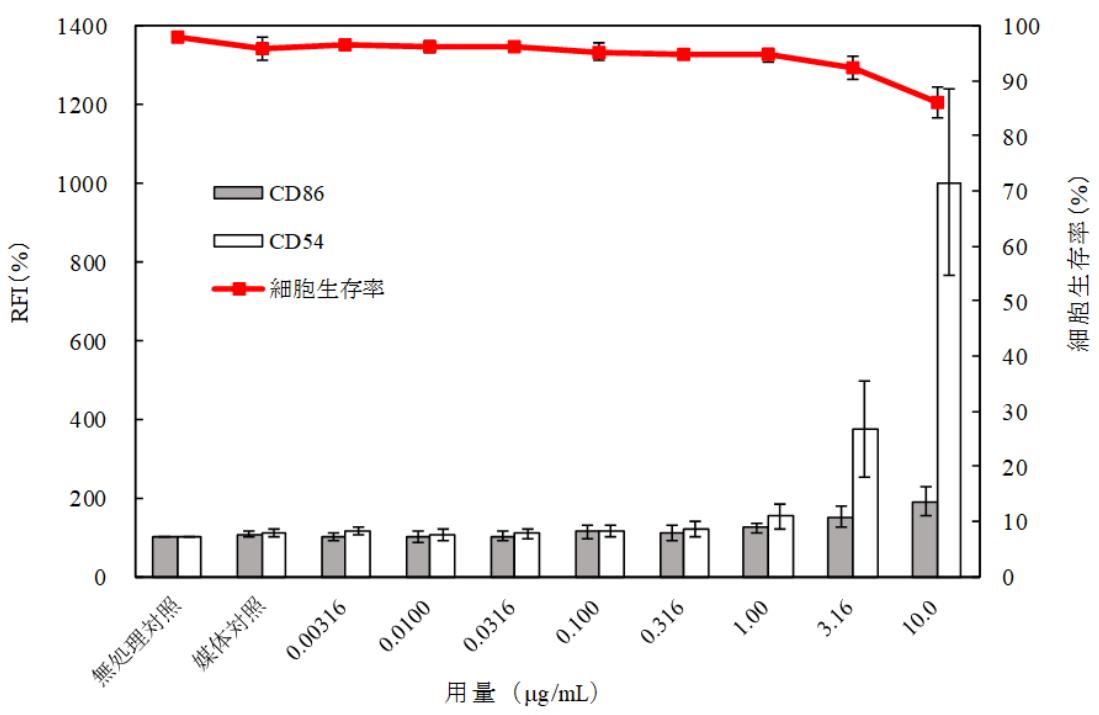


図6 N-MWCNT-7（分散型）のRFI及び細胞生存率（n=3）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの吸入ばく露実験の実施と解析

研究分担者	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	相田麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアル(NM)のマウス吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究(H29-化学-一般-003)を基盤として、短期吸入ばく露された各種NMの免疫系に与える影響についてin vitro/in vivo試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。最終的には、得られた知見を基に各種NMの短期吸入ばく露による毒性発現のAOP(毒性発現経路)およびin vitro試験法を確立する。本分担研究では、先行研究で開発したTaquann法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置(TaquannシステムVer3.0、国立衛研内に設置済)によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとしてマウスに、6時間/日、5日間連続の全身ばく露吸入実験を行い、定期解剖により試料のサンプリングし研究協力者に提供した。今年度はナノシリカ(NM204、JRC)を検体として用いた。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³、高濃度群 30 mg/m³と設定した。動物はC57BL/NcrSlc雄性マウス12週齢を使用し、6hr/day、連続5日間(合計30時間)の全身ばく露吸入を行った。対照群はHEPAフィルターで濾過したクリーンエアーを吸入させた。ばく露実験の結果、実際のばく露濃度の平均値は、低濃度群; 10.3±1.1 mg/m³、高濃度群; 25.6±2.5 mg/m³、MMADは低濃度群; 1,439 nm(og: 3.2~4.2)、高濃度群; 1,468 nm(og: 3.5~4.0)であった。ばく露終了直後、4および8週後に定期解剖を行って試料を採取した。採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。ばく露終了直後の肺重量について、高濃度群では有意に増加していた。今後、肺負荷量、病理組織評価を行い、NM204の吸入ばく露による生体影響を明らかにする計画である。

A. 研究目的

本研究の目的は、ナノマテリアル(NM)のマウス吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究(H29-化学-一般-003)を基盤として、短期吸入ばく露された各種NMの免疫系に与える影響についてin vitro/in vivo試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。得られた知見を基に各種NMの短期吸入ばく露による毒性発現のAOP(毒性発現経路)およびin vitro試験法を確立する。

本分担研究では、検体の分散方法として先行研究で開発したTaquann法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置(TaquannシステムVer3.0、国立衛研内に設置済)によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとしてマウスに5日間の全身ばく露吸入を行った。今年度は被験物質として、ナノシリカを使用した。

B. 研究方法

B-1 被験物質

1. 被験物質:

被験物質として、EU共同研究センター(JRC: Joint Research Centre in Ispra, Italy)から寄付されたナノシリカ(SiO₂-NM204-JRCNM02004)を使用した。

B-2 マウス全身ばく露吸入実験

1. 動物:

C57BL/6NcrSLC(日本エスエルシー株式会社)雄性マウスを10週齢で購入し2週間の馴化期間を経たのち12週齢にて使用した。個体識別は耳パンチにより行った。

2. 飼育条件:

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウターケージとPET製インナーケージを使用した。紙製の

床敷を使用し、1ケージ当り5匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1°C、湿度;55±5%、換気回数;約20回/h、照明時間;8時~20時点灯(照明显暗サイクル12時間)とし、固型飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させた。飲水は滅菌水ディスポーザブルパウチ(Hydropa)を用いて自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック(Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

3. 群構成:

HEPAフィルターを通した清浄空気のみを送気した群(対照群)、NM204ばく露群(低濃度、高濃度)の3群構成とした。目標濃度は、低濃度群10 mg/m³高濃度群30 mg/m³と設定した。各群当たり48匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に9匹、病理組織用に6匹、免疫機能実験用に10匹を割り当てた(表1)。1日6時間(10:00~16:00)、5日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0用に改変したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容する。この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジはインナー、カートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25mL、内寸:直径20mm 高さ80mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジ

に収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている。

NM204 の原末を 35°C に加温した tert-butyl alcohol(TBA) 加えて 2 mg/mL の懸濁液を調整した。TBA 懸濁液を超音波洗浄器 SU-3TH(柴田科学株式会社)にて、40W の出力により 2~15 分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。この懸濁液を Taquann システムで使用するカートリッジに充填した。低濃度群では 3.5 mL/cartridge、高濃度群では 10.5 mL/cartridge を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプ(MD4C NT+AK+EK, Vacuubrand)で TBA を昇華除去することで行った。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:43 L)に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターが接続されている。煙突部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつばく露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.48 MPa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。ばく露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min(基礎換気流量; 29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、ばく露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入ばく露実験において、合計 88 本のカートリッジを使用し、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。

ばく露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力

変動をばく露時間の 6 時間を通してモニタリングした。

実験条件の詳細に関しては、表 2 に記載した。

5. ばく露チャンバー

動物を収容し検体をばく露するばく露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものと、Ver3.0 用に改変したものを利用した。(共同開発柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 25 匹収容が可能である。ばく露チャンバーはアクリル製のアウターチャンバーと PET 樹脂で作製したインナーチャンバー(直径 660 mm、高さ 477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されており、メインチャンバーの気積 179 L である。

6. ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m³)測定を並行して行った。相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter:CPC、CPC-BL01、サンプリング流量:1.5 L/min、柴田科学)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。高濃度での測定は、CPC に負荷がかかるため、CPC の前段に希釈機(柴田科学)を設置して 6 倍希釈し測定した。

ばく露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。

質量濃度測定は、ローポリウムサンプラー(080050-155、φ 55 mm 紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ 55mm、捕集効率

(DOP 0.3 μm): 99.9%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して 1.5 L/min の流量でばく露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min \times 120min = 180 L から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

7. エアロゾルの空気動力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの空気動力学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。10 L/min の流量でばく露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm 、No.2; 5.6 μm 、No.3; 3.2 μm 、No.4; 1.8 μm 、No.5; 1.0 μm 、No.6; 0.56 μm 、No.7; 0.32 μm 、No.8; 0.1 μm 、No.9; 0.10 μm 、No.10; 0.056 μm 、No.11; 0.032 μm 、No.12; 0.018 μm 、No.13; 0.01 μm)に導いた。吸引時間は 40 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

8. 解剖とサンプリング

肺と縦隔、頸下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後 (0W)、4 週後 (4W) 及び 8 週後 (8W) に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器 (TK-7、バイオマシナリー)

を用いイソフルラン (ゾエティス) 麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針 (21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社) を刺入して生理食塩水 (大塚生食注、大塚製薬工場) を約 40cm 水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (フジフィルム和光純薬工業、組織固定用、用時調製) を同静水圧にて約 3 分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針 (サーフローブラッシュ 18G、テルモ) を気管に挿入し PBS を 1 mL 注入・吸引採取する操作を 2 回繰り返し、BAL を採取した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 マウス全身ばく露吸入実験

NM204 の 5 日間反復全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群; 10.3 ± 1.1

mg/m^3 、高濃度群; $25.6 \pm 2.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ (平均値土 SD)であった。3回の測定を行った MMAD は低濃度群; $1,439 \text{ nm}$ (og: $3.2 \sim 4.2$)、高濃度群; $1,468 \text{ nm}$ (og: $3.5 \sim 4.0$)であった。(表 3)。

エアロゾルの累積分布から、粒子径 100 nm から急激に立ち上がる分布であった(図 1C 及び D)。6 時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 616 mg 、 $1,848 \text{ mg}$ であった。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7 m^3 であることから名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ $52.6 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $157.9 \text{ mg}/\text{m}^3$ と計算される。実際に測定した濃度の平均値から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ 19.6% 、 16.2% であった(表 3)。

実験に供したマウスは定期解剖までの間、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図 2、A、B 及び C)。ばく露終了直後(Day0)、4 および 8 週後に定期解剖を行って試料を採取した。ばく露終了直後の肺重量は、対照群 $121.6 \pm 4.9 \text{ mg}$ 、低濃度群 $130.8 \pm 3.4 \text{ mg}$ 、高濃度群 $138.6 \pm 9.2 \text{ mg}$ であり、高濃度群では対照群に比較して有意に增加了(図 2、D)。

採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。

D. 考察

粒子状物質の吸入において、粒径は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルにはばく露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想

定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入ばく露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離纖維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入ばく露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためにには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

本分担研究で用いたナノシリカ NM204 は、分散性が良好であり Taquann 法および Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 により容易にエアロゾル化することが可能であった。NM204 のエアロゾル特性として、MMAD は低濃度群、高濃度群とともに約 $1,500 \text{ nm}$ ($1.5 \mu\text{m}$) であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < $3 \mu\text{m}$ を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる og は $3.2 \sim 4.2$ と TG413 で推奨される $1 \sim 3$ と比較すると、若干広い範囲の粒度分布である。エアロゾルの累積分布において明らかであるように、NM204 エアロゾルは、累積粒子径が 100 nm から急激に立ち上がる分布であるため、MMAD がこのような値を示すと考えられる。一方、エアロゾル化効率は 20%程度であり、先行研究にて使用した多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7(三井)の約 60%から比較すると $1/3$ 程度の値である。CPC の濃度推移を比較すると、NM204 はカートリッジからエアロゾルが噴射された直後の CPC カウントの立ち上がりが MWNT-7 に比較して緩やかである。濃度低下は同様であることから、沈降速度は同じであるが、カートリッジから噴射された検体のうち、サブチャンバーでのトラップされる量が多いのかもしれない(図 3)。

NM204 ばく露によるマウスは、体重推移においては影響が認められていない。肺重量に関しては、ばく露終了直後である Day0 において、低濃

度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4週後及び8週後では有意な変化は認められなかった。NM204の肺負荷量は5日間の連続ばく露で次第に増加するため、その影響と考えられるが、ばく露終了後は比較的速やかに肺から排泄されるのかもしれない。

今後、サンプリングした肺の病理組織と肺負荷量測定を行い、NM204の影響を明らかにする計画である。

E. 結論

NM204の高分散乾燥検体をもちいて、マウスに1日時6時間、5日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、低濃度群； $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMADは低濃度群、高濃度群ともに $1.5\mu\text{m}$ 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。肺重量に関して、5日間ばく露終了直後の肺では、高濃度群で有意な増加がみられたが、4及び8週後では変化はみとめられなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, Fundam Toxicol, Sci. 2022, 9(1),17-21,
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, Fundam Toxicol, Sci. 2021,8(6),169-175, doi.:10.2131/fts.8.169

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, Cancer Sci. 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1-μm aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, Int J Pharm. 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.

2. 学会発表

高橋 祐次：粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第36年会、招待講演(2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次：吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第48回日本毒性学会学術年会、シンポジウム(2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure			
		N	Day 0	4W	8W
Control Clean air 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			
NM204 Low concentration Target conc. 10 mg/m ³ 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			
NM204 High concentration Target conc. 30 mg/m ³ 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			

表 2 吸入ばく露実験条件のまとめ

Concentration of NM204 in tert-butyl alcohol (NM204-TBA)	2 mg/mL
Aliquot of NM204-TBA per cartridge	
Low concentration	3.5 mL
High concentration	10.5 mL
Load of NM204 per cartridge as dry-powder	10 mg
Low concentration	7 mg
High concentration	21 mg
Exposure time	6 hr/day for consecutive 5 days
Injection interval per cartridge	4 min
Number of cartridge used for 6hr exposure	88
Ventilation air volume in main chamber	32.5LPM
Sampling flow rate of CPC	1.5LPM
diration of sampling flow rate of CPC	6 times
Sampling time of MOUDI	40 min

表3 吸入ばく露実験結果(エアロゾル特性)

NM204 (6hr/day for consecutive 5 day)	Mean	SD
Mass Concentration (mg/cubic meter)		
Low concentration	10.3	1.1
High concentration	25.6	2.5
Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)		
Low concentration	52.6	
High concentration	157.9	
Aerosolization efficiency (%)		
Low concentration	19.6	2.1
High concentration	16.2	1.6
MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=3)		
Low concentration	1,439	$\sigma g: 3.2 \sim 4.2$
High concentration	1,468	$\sigma g: 3.5 \sim 4.0$

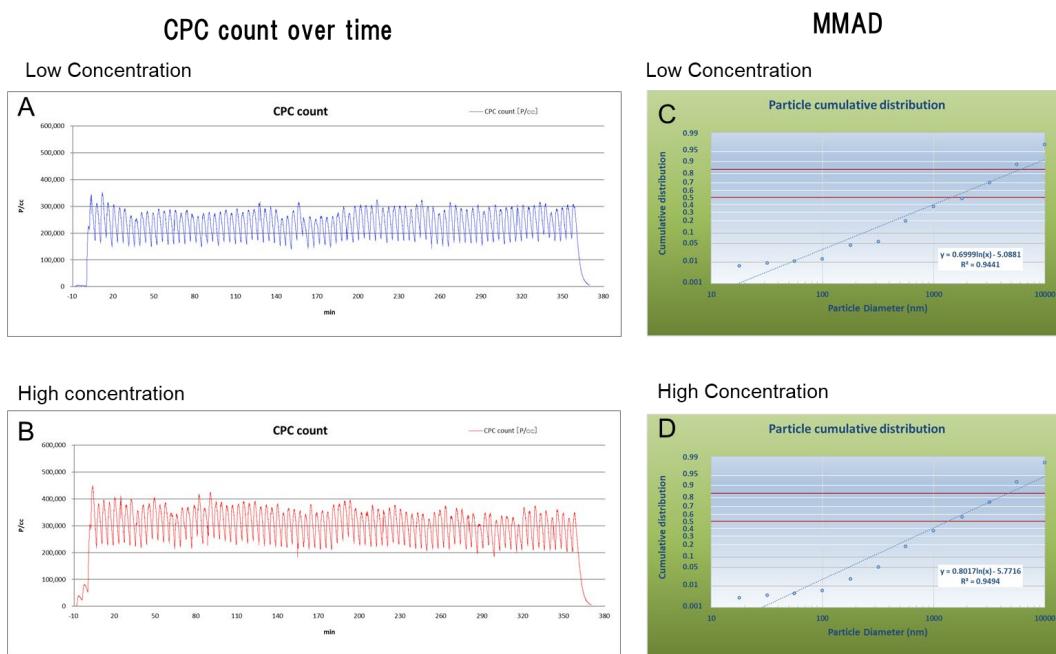


図1 NM204 の CPC カウント及び MMAD 解析グラフ

NM204 の MMAD 解析グラフでは 100nm 付近から急激に立ち上がる傾向にあった。

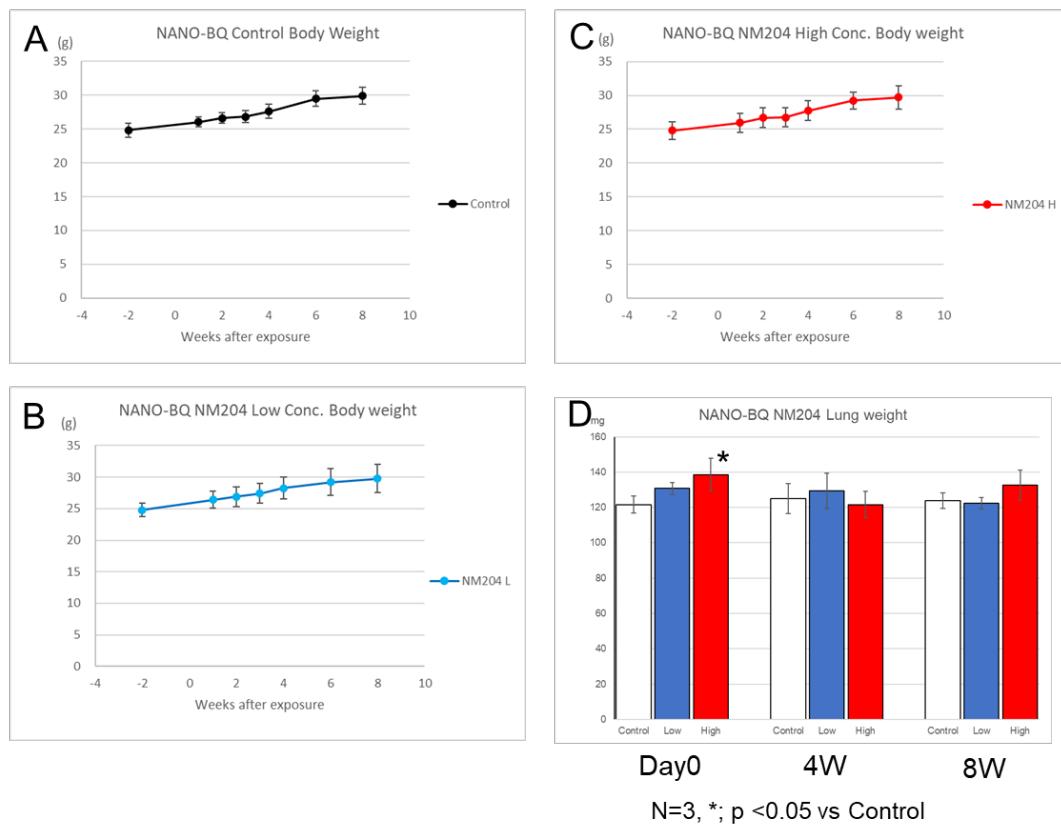


図2 NM204 ばく露マウスの体重推移及び肺重量

A:対照群の体重推移、B:低濃度群の体重推移、C:高濃度群の体重推移。体重推移には NM204 ばく露の影響は認められなかった。D:肺重量データ。ばく露終了直後である Day0 において、低濃度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4 週後及び 8 週後では有意な変化は認められなかった。

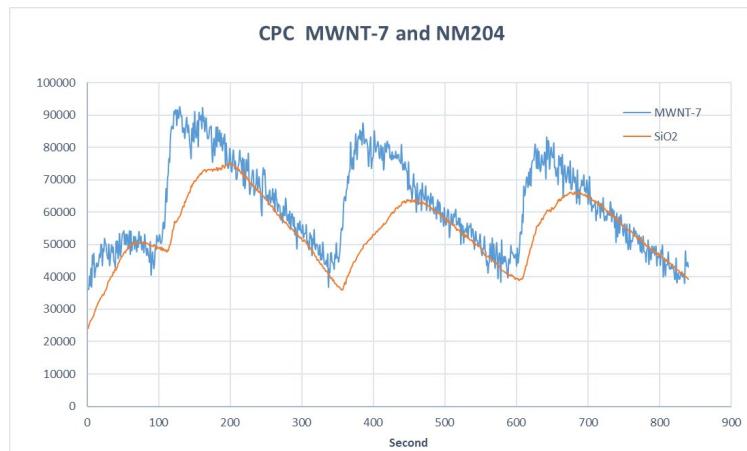


図3 MWNT-7 と NM204 の CPC データの比較

NM204 のエアロゾル化効率は 20%程度と MWNT-7 の 1/3 程度の値であった。MWNT-7 は、カートリッジから噴射された直後から速やかに CPC カウントが上昇するが、NM204 の濃度上昇は緩やかであった。減衰は同様の推移であった。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系に関する研究
—様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価と
細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明に関する研究—

研究分担者 飯島 一智 横浜国立大学大学院工学研究院 准教授

研究要旨

短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (NM) が免疫系に与える影響に関する *in vitro* 試験法の確立を目指し、本研究では種々の銀ナノ粒子、シリカナノ粒子、二酸化チタン NM について抗原提示細胞活性化能の評価を行なった。評価としては、従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の *CD86*, *CD54*, マクロファージエラスター *Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)* 遺伝子の発現を指標とする新たな手法についても検討した。

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。シリカナノ粒子、二酸化チタン NM とともに、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、評価指標としての有効性が示唆された。*CD54* と *MMP-12* の発現の乖離も見られ、今後、毒性評価における意義について検討を進める。シリカナノ粒子においては粒子調製法や粒子径、二酸化チタン NM においては結晶型や結晶形状による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。

また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。共培養系において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも下部の THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進がみられ、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系が、細胞間クロストークを含めたナノマテリアルの毒性評価系となりうる可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (NM) が免疫系に与える影響について毒性メカニズムの解明と *in vitro* 評価系の開発を行い、得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の AOP (毒性発現経路) および *in vitro* 試験法の確立と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。今年度は、これまで抗原提示細胞の活性化の指標として用いてきた *CD54*,

CD86 の発現に加え、マクロファージエラスター *Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)* 遺伝子発現の有用性についても検討を行い、様々な特徴を有する各種 NM の解析を行った。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の確立を目指した。

B. 研究方法

B.1. 各種ナノマテリアル分散液の調製

各種ナノマテリアルの分散液は以下の方法により調製した。

銀ナノ粒子

銀ナノ粒子は BioPureTM 銀ナノ粒子分散液 (nanoComposix, 一次粒径 10.3 ± 1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml および一次粒径 52 ± 6 nm, 濃度 1.04 mg/ml) を用いた。40 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培地を用いて所定濃度まで希釈した。購入時の銀ナノ粒子分散液の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) により測定した。

シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204 (以上 The European Commission's Joint Research Centre (JRC)) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。分散液として購入した Sicastar-F 以外のシリカナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220°C , 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるようにシリカナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で PWM 80%, 5 min の条件で 2 回処理した。これを 2 倍希釈することで stock 溶液とし、培地を用いて所定濃度に希釈した。

二酸化チタンナノ粒子

二酸化チタンナノ粒子は MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上ティカ株式会社) および TiDW (石原産業株式会社) を用いた。二酸化チタンナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220°C , 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。4 mg/ml の濃度になるように二酸化チタンナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で PWM 80%, 1 min の条件で処理した。培地

を用いて所定濃度に希釈し、再度プローブ型超音波装置により同様の条件で処理した。

B.2. 表面マーカー発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1 細胞懸濁液 500 μl および各被験物質の分散液または溶液 500 μl を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置した。被験物質の曝露濃度は THP-1 細胞の生存率が 75% となる濃度 (CV75) を基準とし、公比 1.2 で上下合計 8 濃度を設定した。曝露後の THP-1 細胞を 10 % BSA 含有リン酸緩衝液 (PBS) (FB) で洗浄後、0.01 % グロブリン, 10% BSA 含有 PBS にて 15 分間ブロッキングした。96 ウェルプレートの各ウェルに分注した細胞をそれぞれ FITC 修飾された抗 CD54 抗体、抗 CD86 抗体および IgG で 30 分間処理した後、FB で細胞を洗浄、ヨウ化プロピジウムを添加した。フローサイトメトリーを用いて FL-1 チャネルおよび FL2 チャネルの強度を測定し、CD54, CD86 の発現を培地処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求めるとともに、細胞生存率を算出した。

B.3. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化は、24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells の THP-1 細胞を播種し、400 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 3 日間、その後 PMA 不含培地で 5 日間培養することで行った。

24 ウェルプレートに播種・培養された未分化および分化 THP-1 細胞に対し、所定濃度の各被験物質の分散液を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置した。培養後の未分化および分化 THP-1 細胞は PBS で 2 回洗浄し、RNeasy mini を用いて添付

のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を用いて、リアルタイム PCR により、*CD86*, *CD54*, *MMP-12*, *GAPDH* 遺伝子の発現を測定し、*GAPDH* を対照とする $\Delta\Delta Ct$ 法により遺伝子発現量を定量した。

B.4. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

プロトコルに従い、市販のヒト気管支上皮細胞の気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。気管支上皮モデルの作製は経上皮電気抵抗 (TEER) 測定および標本の形態観察により評価を行なった。ウェルプレートのウェルに未分化 THP-1 細胞の懸濁液を入れ、気管支上皮モデルを含むセルカルチャーインサートを設置し、上部もしくは下部よりシリカナノ粒子 (Sicastar-F) 分散液を加えた。24 時間培養後、B.2. の手法にて THP-1 細胞の *CD86*, *CD54* の発現および細胞生存率を測定した。この際、培地として THP-1 細胞の培養に用いる 10% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地を用いた。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

C.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

直径約 10 nm および 50 nm いずれの銀ナノ粒子処理においても *CD86* および *CD54* の発現の増加が見られた (図 1)。直径約 10 nm の銀ナノ粒子の EC150 (*CD86* 発現が 150% を超える濃度), EC200 (*CD54* 発現が 200% を超える濃度) は 127.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 118.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、直径約 50 nm の銀ナノ粒子

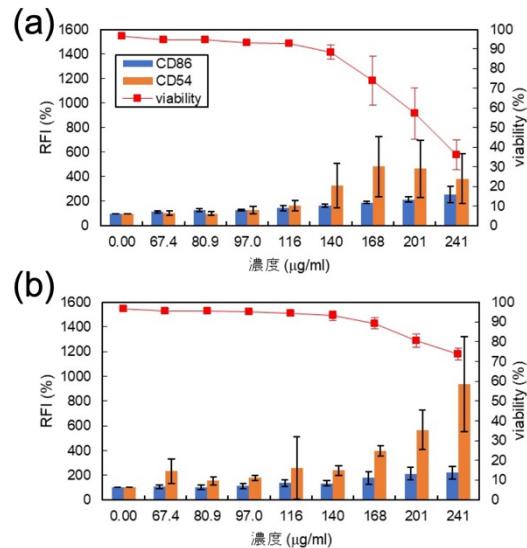


図 1 直径約 10 nm (a) および直径約 50 nm (b) 銀ナノ粒子処理 THP-1 細胞の *CD86* および *CD54* の発現

は 159.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 122.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方がわずかに低濃度であった。

C.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

各種シリカナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現を図 2 および図 3 に示す。ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。全体的な傾向として、未分化 THP-1 の方が遺伝子発現の上昇幅が大きい傾向が見られた。一方、ナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

二酸化チタンナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現を図 4 および図 5 に示す。ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。ナノシリカ粒子と同様にナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

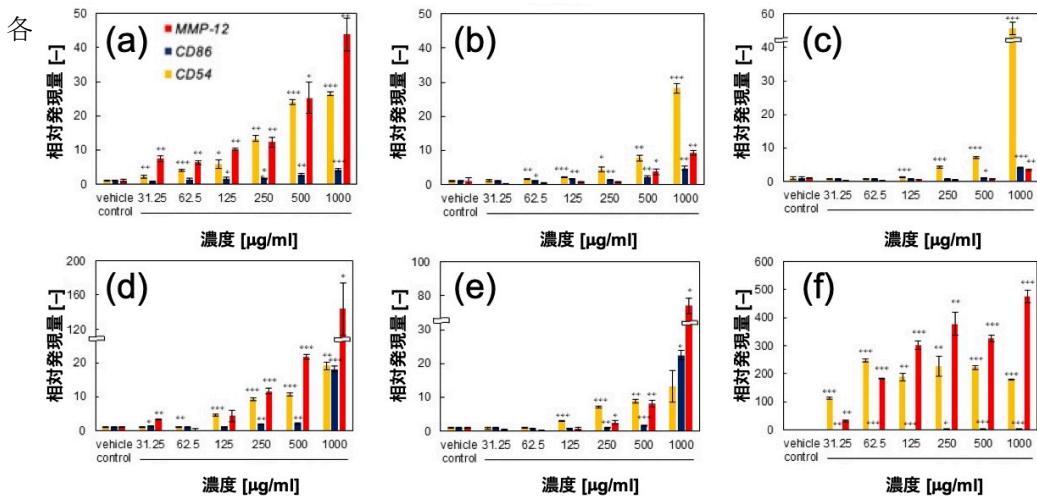


図2 各シリカナノ粒子処理未分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)NM-204, (b)NM-200, (c)NM-201, (d)NM-203, (e)NM-202, (f)Sicastar-F.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

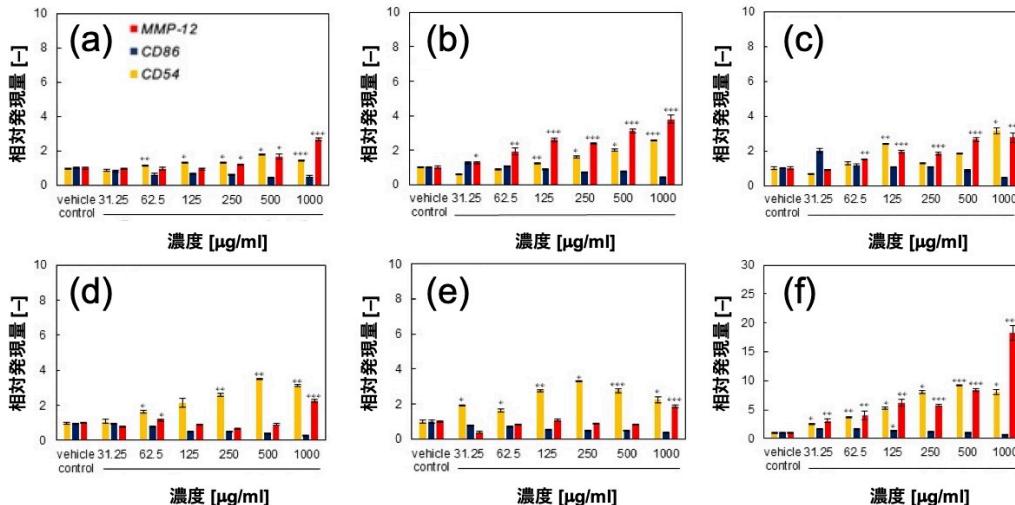


図3 各シリカナノ粒子処理分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)NM-204, (b)NM-200, (c)NM-201, (d)NM-203, (e)NM-202, (f)Sicastar-F. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

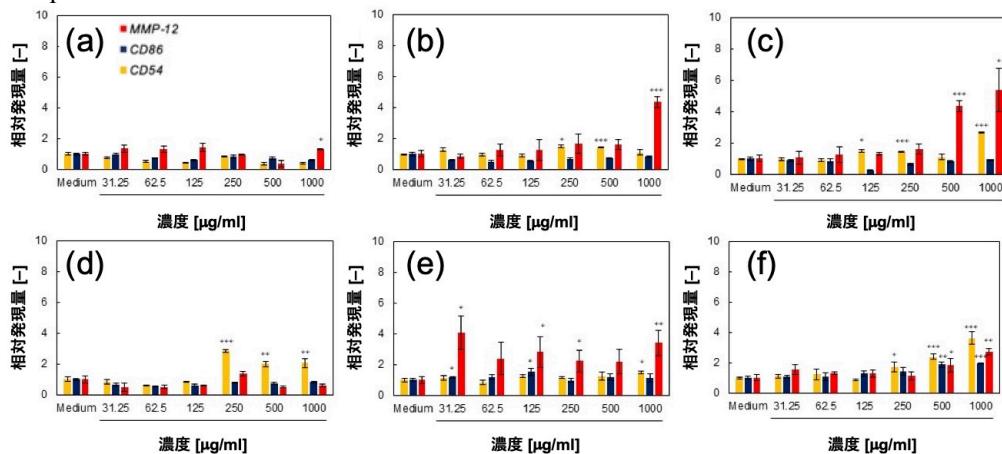


図4 各二酸化チタンナノ粒子処理未分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)MT-150A, (b)MT-500B, (c)TiDW, (d)AMT-100, (e)AMT-600, (f)TKP-102. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

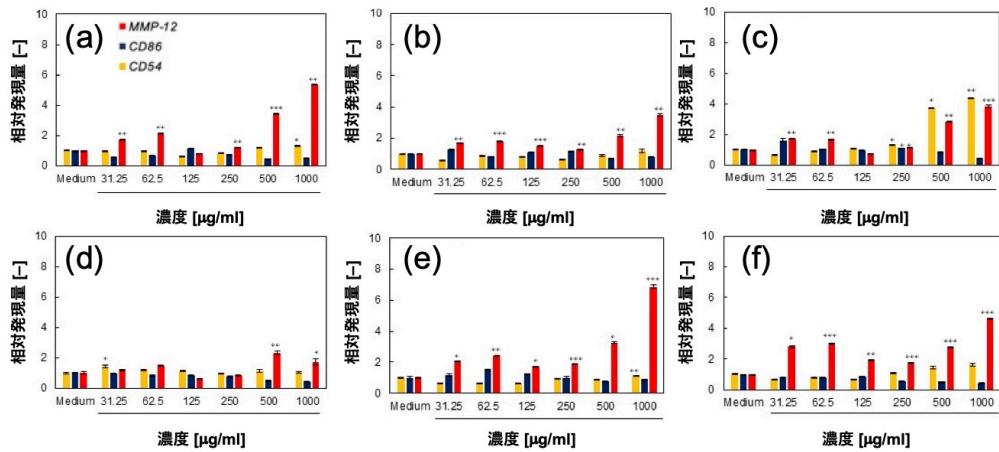


図5 各二酸化チタンナノ粒子処理分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)MT-150A, (b)MT-500B, (c)TiDW, (d)AMT-100, (e)AMT-600, (f)TKP-102. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

C.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞の気-液界面培養 14 日目(図 6)において緻密な構造が見られるとともに纖毛の運動が観察された。TEER 測定では 500-600 Ωcm^2 となり未分化状態での約 $70 \Omega \text{cm}^2$ より上昇していた。

作製された気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養を行った。単培養と気管支上皮細胞との共培養の THP-1 細胞との間で CD54, CD86 の発現や細胞生存率に差は見られなかった。次に、気管支上皮細胞の上部または下部よりシリカナノ粒子(Sicastar-F)を添加した。気管支上皮細胞の上部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露よりも低いものの CD54 の発現

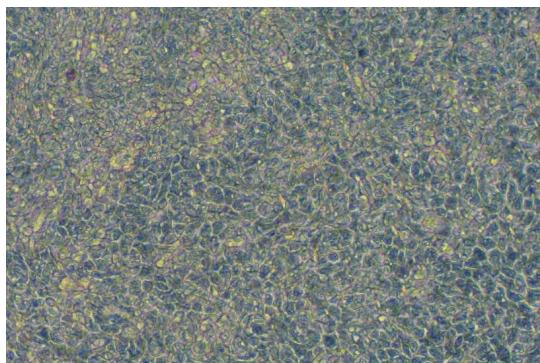


図 6 気-液界面培養 14 日目の気管支上皮細胞の光学顕微鏡像

の増加が見られた。気管支上皮細胞の下部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露のおよそ 2 倍の CD54 の発現が見られた。

D. 考察

D.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

EC150(CD86 発現が 150% を超える濃度)の比較において、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の 127.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対し、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は 159.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方が、抗原提示細胞活性化能がわずかに高い可能性が示された。

この要因として、粒子径による取り込み挙動の変化と溶出銀イオン濃度の影響が考えられる。銀ナノ粒子からは銀イオンの溶出が見られ、溶出率は直径約 50 nm の銀ナノ粒子の 0.1% に対し、直径約 10 nm の銀ナノ粒子では 2.0% と高くなっていた。銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとして作用していることが示唆された。

D.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子処理において、未分化お

および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の新たな指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、沈降法により調製された粒子（NM-204, NM200, NM201）と比較して、高熱法（NM-203、NM-202）およびストーバー法（Sicastar-F）により調製された粒子の方が *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、粒子調製法による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。同一調製法においては、流体力学径が小さいものほど *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、抗原提示細胞の活性化は粒子の細胞への取り込みに依存している可能性が示唆された。一方、分化 THP-1 においては、流体力学径の影響はほとんど見られず、分化による貪食能が高まったためと考えられた。高熱法により調製されたナノ粒子において *CD54* が発現亢進したのに対し、*MMP-12* の発現はほとんど変化せず、*CD54* と *MMP-12* の発現の乖離が見られた。今後、この原因や毒性評価における意義について検討を進める。

二酸化チタンナノ粒子処理においても、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、ルチル型粒子（MT-150A, MT-500B）と比較して、アナターゼ型粒子（AMT-100, AMT-600, TKP-102）の方が *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、結晶型による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。ルチル型での比較においては、流体力学径が小さいものほど *CD54, MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、シリカナノ粒子と同様に細胞への

取り込みの依存が考えられた。未分化・分化 THP-1 いずれにおいても、ルチル型の中で針状結晶の TiDW が *CD54* と *MMP-12* の高発現を誘導し、形状による抗原提示細胞活性化能の違いも示唆された。

D.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞との共培養において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進がみられた。気管支上皮細胞を透過した Sicastar-F もしくは Sicastar-F を曝露された気管支上皮細胞からの分泌物により THP-1 細胞の *CD54* 発現量が増加したことが示唆された。気管支上皮細胞の下部から直接曝露した際の *CD54* の発現量は、THP-1 単培養時の 2 倍ほどであった。気管支上皮細胞からの分泌物が抗原提示細胞の活性化能（*CD54* 発現量）に影響を及ぼすことが示唆され、気管支上皮細胞の分泌する液性因子の影響と考えられる。本共培養系が、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との細胞間クロストークを含めた評価系となりうる可能性が示された。

E. 結論

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。現在、ウェスタンブロッティングを用いて、毒性発現における細胞内経路の解析も進めている。

従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の *CD86, CD54* 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の *CD86, CD54, MMP-12* 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗

原提示細胞との共培養系を確立した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

- 1) ○西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子,
飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9)
- 2) ○西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子,
飯島一智: THP-1細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13)
- 3) ○鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 未分化および分化THP-1細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化およびMMP-12遺伝子発現の解析, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13)
- 4) ○Iijima K, Nishida A, Suzuo M, Miura Y, Ashikaga T, Ohno A: Analysis of An antigen-presenting Cell Activation by Nano materials Using Monocytic Cell Line, APA NANOFORUM-2022 (2022.2.24-26) (Invited talk)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

研究分担者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者	新垣 理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	木野 優子	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	大塚 邦紘	徳島大学病院
	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所
	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ナノマテリアル (NM) はその組成や形状によってマクロファージなどの貪食細胞の反応性は大きく異なっている。令和3年度の本分担研究では、令和2年度の研究に引き継いで、*in vivo*において針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露による肺の免疫システムに関して、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞を中心に細胞表面分子、サイトカイン、ケモカインおよび炎症関連分子の遺伝子およびタンパク発現を免疫学的手法にて検討を加えた。針状酸化チタンの吸入暴露実験では、肺胞マクロファージの分画に著変が見られなかつたことから、ナノマテリアルの形状および性状によって免疫反応に相違がある可能性が示された。また、T-CNT および針状酸化チタンを用いた *in vitro* の実験によってマクロファージからの MMP-12 を介した慢性炎症機転が示唆された。さらに、針状酸化チタンの暴露で炎症性サイトカインの產生亢進の機序が考えられた。一方で、*in vitro* での RAW264.7 細胞を用いた検討では、TiDW 添加では細胞増殖、細胞毒性に大きな影響はなく、さらに、MMP12 の発現も観察されなかつたことから、MWCNT でみられたマクロファージへの影響とは異なっていることが示された。以上から、NM の形状によってマクロファージの反応性は大きく異なっていることが明らかになった。

A. 研究目的

R3 年度の本研究では、昨年度から継続して実施している針状酸化チタンの全身吸入暴露による肺胞マクロファージを中心とした肺免疫システムへの影響に関して、免疫学的手法を用いて検討を加えた。また、多層化カーボンナノチューブおよび針状酸化チタンを *in vitro* での細胞株を用いた実験系にて MMP-12 を介した細胞の変化を詳細に検討した。ナノマテリアルの形状あるいは性状による免疫系の変化を詳しく検討することで、ナノマテリアルの毒性の評価系の確立を目指した。

B. 研究方法

R2 年度に実施した実験で得られたサンプル解析の継続を実施した。Taquann 処理した針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露後、4 週および 8 週での肺組織および BALF 細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法にて各種関連遺伝子 mRNA 発現を検討した。加えて、加えて、次年度に計画しているナノシリカ (NM-204) の全身吸入による肺免疫反応の解析を準備しており、これまでの NM 吸入暴露実験との比較検討を行う予定である。また、RAW264.7 細胞を用いて、T-CNT および FLT-300 (TiDW) を添加することによる細胞形態、増殖、MMP12 mRNA 発現を検討した。

以下に定量 RT-PCR で用いたプライマー配列を示す。MMP12; forward (f) 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATT-3', reverse (r) 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', F4/80; (f) 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', (r) 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTATCGTG-3', MCP-1; (f) 5'-CTGGATCGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3', TLR-4; (f) 5'-CAGTGGTCAGTGTGATTGTGG-3', (r) 5'-TTCCTGGATGATGATGTTGGCAGC-3', IL-1 β ; (f)

5'-TGATGAGAATGACCTGTTCT-3', (r) 5'-CTTCTCAAAGATGAAGGAAA-3', IL-6; (f) 5'-GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA-3', (r) 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3', IFN- γ ; (f) 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3', (r) 5'-GTCACAGTTTCAGCTGTATAGGG-3', IL-10; (f) 5'-ATCGATTCTCCCCTGTGAA-3', (r) 5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3', TGF- β ; (f) 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', (r) 5'-GGCGTATCAGTGGGGTCAG-3', iNOS; (f), 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3', (r), 5'-GGGAGTAGCCTGTGTCACCTGGAA-3', CCR2/CD192; (f) 5'-CCATGCAAGTTCAAGCTGCCT-3', (r) 5'-TGCCGTGGATGAACTGAGG-3', CD206; (f) 5'-GTACCTCACAGGATTAACCAGTTC-3', (r), 5'-CAGGGTTAGTGACACACAGCTC-3', Tim4; (f) 5'-GCTGCTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3', Arginase-1; (f) 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3', (r) 5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3', β -actin; (f) 5'-GTGGCCGCTCT AGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTAGGGTTCAGGGGG-3'。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として国立医薬品食品衛生研究所および徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

TiDW の吸入暴露後（図 1）、4 週および 8 週において肺組織における F4/80、iNOS、 CCR2、CD206、Arg1、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 、 TLR-4、CD54/ICAM-1、Tim4 の mRNA の発現は対照群と比較して変化はなかったが、 TiDW 暴露後 8 週において、 MCP-1、 TNF- α 、 IFN- γ mRNA 発現が対照群に比較して有意に上昇していた（図 2、3）。一方、 BALF 細胞における F4/80、MCP-1、iNOS、 CCR2、CD206、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、TLR-4、CD54/ICAM-1 および Tim4 mRNA 発現は TiDW 暴露で変化は認められなかつたが、暴露後 4 週での MMP-12 mRNA 発現は対照群に比較して有意に上昇していた（図 4、5、6）。この結果は肺組織における MMP12 mRNA の発現上昇と一致する（令和 2 年度報告済み）。

RAW264.7 細胞への T-CNT および TiDW の添加による変化を観察すると、T-CNT の添加で細胞のサイズが対照細胞に比較して有意に大きくなっていたが、TiDW の添加では T-CNT 処理ほどは大きくなつていなかつた（図 7）。また、TiDW 暴露によって細胞数あるいは生存率に影響は観察されなかつた。加えて、T-CNT の添加で上昇していた MMP12 mRNA 発現は TiDW 刺激では上昇しなかつた（図 8、9）。

D. 考察

TiDW 吸入暴露後 4 週にて肺組織ならびに BALF 細胞にて MMP12 mRNA 発現が上昇し、暴露後 8 週の肺組織で MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が上昇したことから、 TiDW が肺内で暴露されると、肺胞マクロファージの MMP12 を介したが活性化が誘導され、その後炎症性変化が肺組織に広がつていいた可能性が考えられる。In vitro では TiDW のマクロファージへの直接の作用

を確認すると、T-CNT で見られたような MMP12 発現上昇は確認されなかつたことから、ナノマテリアルの形状や性状によつてマクロファージの動態は大きく異なつていることが示唆された。

なお、本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかつた。

E. 結論

マクロファージの MMP12 を起点と活性化機構がナノマテリアルの毒性評価法の確立に重要な位置を占めている可能性を考えられ、 *in vitro* および *in vivo* の評価系を総合した毒性試験が必要であると考える。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T. PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immunol.* 2022; 23(3):399-410. doi: 10.1038/s41590-021-01125-7.
2. Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa. *Inflammation.* 2022;45(3), 1348-1361. doi: 10.1007/s10753-022-01624-1
3. Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogouchi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T. von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation. *J Cell Physiol.* 2021, 237(3):1964-1979. doi: 10.1002/jcp.30667

4. Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO. Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr.* 2021, 69(3):238-246.
5. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by Fosobacterium nucleatum infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14943.
6. Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, Ishimaru N, Kamioka H. Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp 1a1 signaling axis. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14927
7. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly MC, Awasthi P, Takada K, Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8+ T cells in the cortex independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904. doi:10.1084/jem.20201904.
3. 石丸直澄 口腔科学を牽引する基礎研究の展望 日本補綴歯科学会 第 130 回記念学術大会シンポジウム (2021. 6. 20 ウェブ)
4. 石丸直澄, 新垣理恵子, 常松貴明, 高橋祐次, 菅野純 ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9 神戸)
5. 佐藤真美, 牛尾綾, 福田一稀, 俵宏彰, 大塚邦紘, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の病態探索 第 29 回日本シーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
6. 田村海, 新垣理恵子, 太田康, 石丸直澄 シーグレン症候群モデルマウスを用いたドライノーズ病態の解析 第 29 回日本シーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
7. 俵宏彰, 新垣理恵子, 大塚邦紘, 石丸直澄 シーグレン症候群モデルマウスを用いた M3PAM を用いた治療効果とその作用機序 第 29 回日本シーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
8. 石丸直澄 基礎歯学研究の進化と展望 第 63 回歯科基礎医学会先端歯学国際教育ネットワークシンポジウム (2022.10.9 ウェブ)
9. 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 HPV 陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明 第 57 回口腔組織培養学会学術大会 (2021.11.6 ウェブ)
10. Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)

F.2 学会発表

1. 新垣理恵子, 清水朱里, 佐藤真美, 俵宏彰, 常松貴明, 石丸直澄 唾液腺における常在型自然リンパ球の同定とシーグレン症候群病態への関与 第110回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23 東京)
2. 佐藤真美, 牛尾綾, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 第 110 回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23 東京)

11. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H,
Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA
sequencing reveals accumulation of CD4 and
CD8 T cells with unique phenotypes in
salivary glands of Sjögren's syndrome model
mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会
(2021.12.9 奈良)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1

実験プロトコール

In vivo実験



In vitro実験

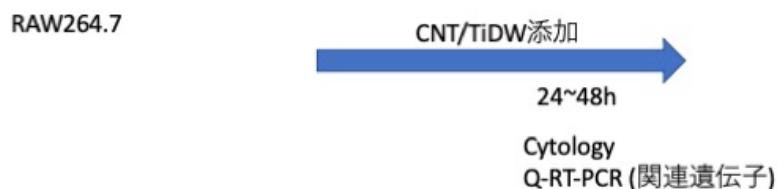


図2

TiDW吸入暴露後の肺組織におけるマクロファージ関連分子のmRNAの発現

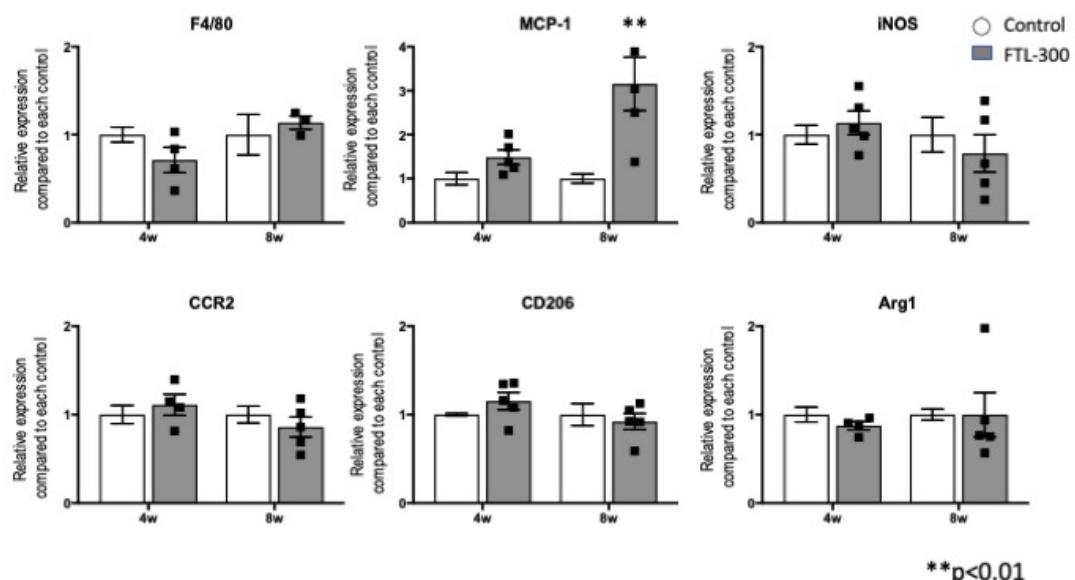
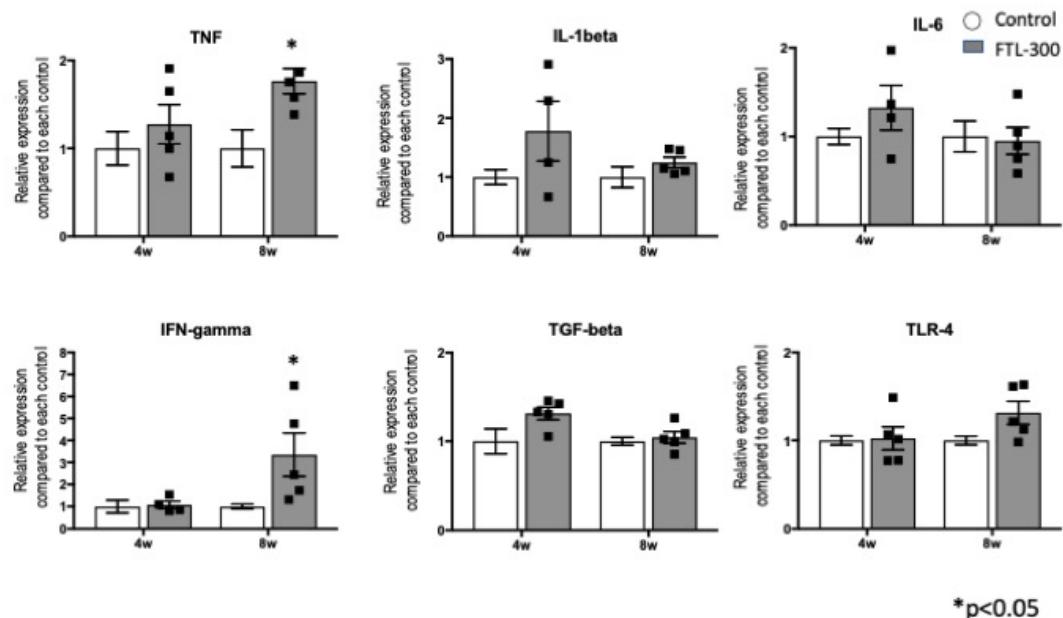


図3

TiDW吸入暴露後の肺組織におけるCytokineおよびTLR4 mRNAの発現



*p<0.05

図4

TiDW吸入暴露後のBALF細胞におけるCD54 mRNA, Tim4 mRNA およびMMP12 mRNA発現

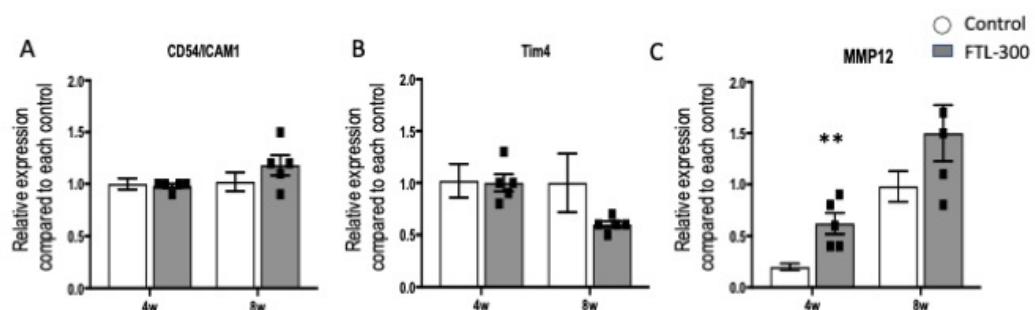


図4 TiDW吸入暴露後のBALFにおけるCD54 mRNA、Tim4 mRNAおよびMMP12 mRNA発現

A : CD54/ICAM-1 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5)

B : Tim mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5)

Tim4: T-cell membrane protein 4: a phosphatidyl serin receptor

C : MMP12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5), **p < 0.01

図5

TiDW吸入暴露後のBALF細胞におけるマクロファージ関連分子のmRNA発現

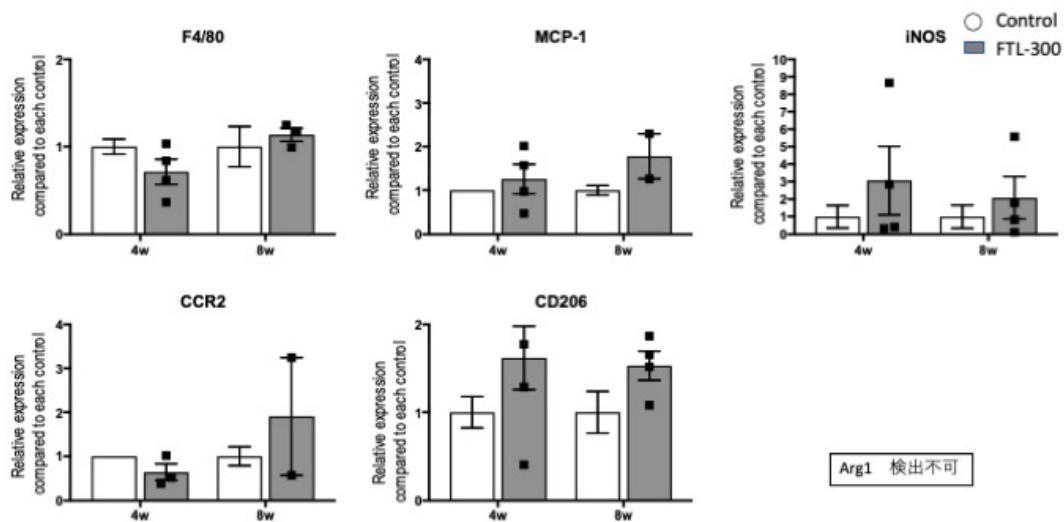


図6

TiDW吸入暴露後のBALFにおけるCytokineおよびTLR4 mRNA発現

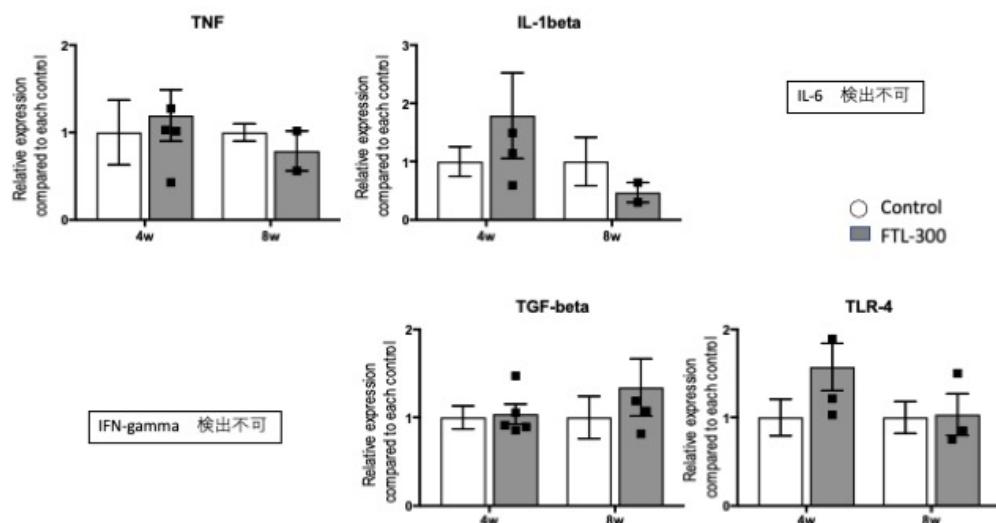


図7
RAW264.7細胞へのT-CNTおよびFLT-300(TiDW)の影響

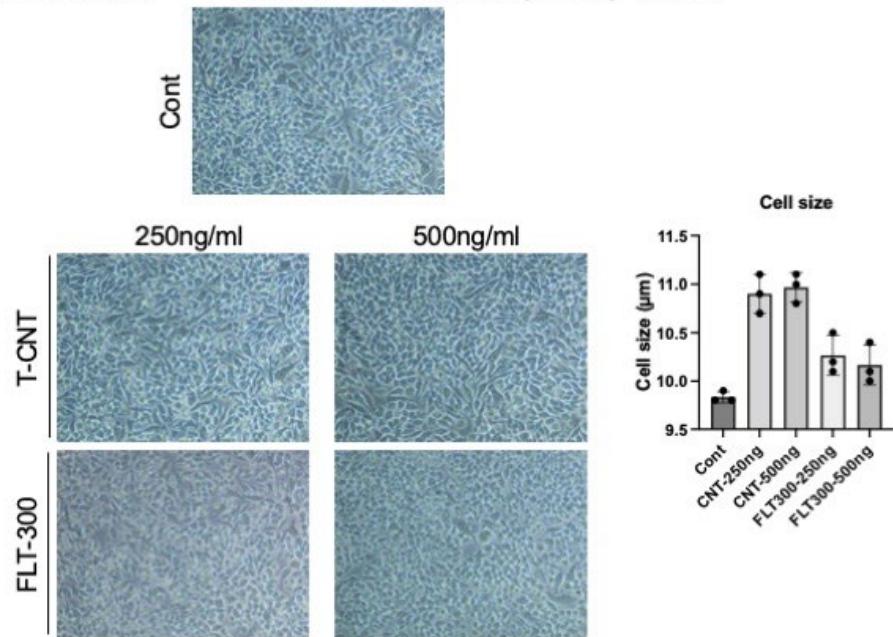


図8
RAW264.7細胞へのT-CNTおよびFLT-300(TiDW)の影響

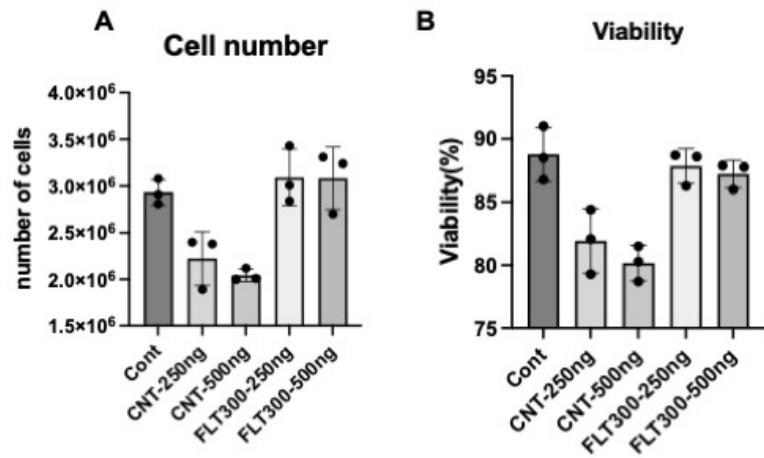


図9

RAW264.7細胞におけるTiO₂およびCNT暴露によるMMP12 mRNA発現

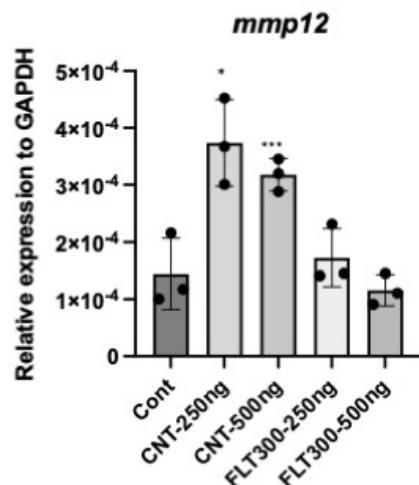


図9 MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果 (GAPDHに対する相対値) = 平均値±SD (triplicate), *p < 0.05, ***p < 0.0005

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する*in vitro/in vivo*評価手法
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの*in silico* 評価系に関する研究

研究分担者 大野 彰子
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者 広瀬 明彦
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究要旨

本研究では、短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (NMs) の免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発や得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の毒性発現経路 (AOP)、*in vitro* 試験法の確立および将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。令和3年度の対象とした被験物質は、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO_2 NPs:NM200-JRCNM02000,NM201-JRCNM02001,NM202-JRCNM02002,NM203-JRCNM10404, NM204- JRCNM02004) とした。 SiO_2 NPs の情報収集源は、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) およびナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状、*in vivo* 試験の有害性情報について、さらに当研究班で実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による評価および評価試験溶媒中での物理化学的性状の追加試験により得られたデータについて収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。これらの収集データは、物理化学的性状の特性評価や、ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価として、物理化学的性状データと有害性データとの関連性解析を実施し、*in silico* 評価系に資する解析手法の確立と毒性メカニズムの予測を目指す。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、同じ物質でも1つの次元でナノ領域 (100 nm未満) の大きさにある粒子と定義されており、結晶構造など物性の違いにより、多彩な機能を生ずる特性を有している。近年、ナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用の

拡大と共に、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的特性や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価法や、有害性を示すような物理化学的性状の特徴を見出すこと

が必要とされる。諸外国ではナノマテリアルの規制への枠組みが進められているが、国内では未だ整備が進んでいない現状である。

二酸化ケイ素 (SiO_2) の結晶多形は、圧力や温度などの条件により様々に形成し、結晶シリカ（一般的には石英）や、非晶質（シリカゲルや珪藻土）に大別される。

国際がん研究機関 (IARC) は、結晶質シリカ（石英やクリストバル石CAS:14808-60-7）をヒトへの発がん物質（グループ1）と分類している。炭素 (C) とケイ素 (Si) の1:1の化合物である鬚状炭化ケイ素 (CAS: 409-21-2) は、ヒトに対しておそらく発がん性がある物質（グループ2A）、また、纖維状炭化ケイ素 (CAS: 308076-74-6) はヒトに対して発がん性の可能性がある物質（グループ2B）、一方、非晶質二酸化ケイ素のヒトへの発がん性は分類できない（グループ3）としている。しかし、二酸化ケイ素のナノ粒子 (SiO_2 NPs) の安全性評価は進んでおらず、ヒトへの暴露による健康影響の評価が重要な課題となっている。さらに、 SiO_2 NPsの毒性試験結果の報告件数が未だ少ないとから、より多くのデータを収集・整備していく必要がある。

本研究では、短期吸入曝露された各種 NM の免疫系に与える影響について、*in vitro/in vivo* 試験法研究の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に *in vitro* 試験法の確立と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。

令和3年度は、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO_2 NPs: NM200-JRCNM02000, NM201-JRCNM02001, NM202-JRCNM02002, NM203-JRCNM10404, NM204-JRCNM02004) を対象化合物とし、

物理化学的性状（物性）・有害性情報の収集・情報整理を行った。 SiO_2 NPs の情報収集源は、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) およびナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状、*in vivo* 試験の有害性情報について、さらに当研究班が実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による評価では物理化学的性状の追加試験により得られたデータについて収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。

B. 研究方法

B1.1. 本研究で実施する対象化合物：5種の二酸化ケイ素ナノ粒子

SiO_2 NPs (NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204) were donated by European Commission, Joint Research Center (JRC), JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy) (Table 1).

B1.2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

OECD で公表されている Silicon dioxide (NM-200—NM-204) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文、また本研究班の足利研究代表者が実施した h-CLAT 毒性試験結果および飯島分担研究者が実施した h-CLAT 毒性試験の溶媒中の物性評価 (Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi) を調査対象情報源とした (Table 2, Table 3)。

- 物理化学的性状データは、凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、その他のプロパティ等、また DLS 測定データは、本研究班の横浜国大飯島分担研究者の測定データについて約 65 項目を収集・整理した (Table 2A, 2B)。
- 有害性情報データは、本研究班の足利研究代表者が実施した *in vitro* 試験結果 (h-CLAT 毒性試験) を収集整理し、*in vivo* 試験結果（鼻部吸入暴露試験_気管内投与試験）は OECD の公開データより収集・整理した (Table 3, 4, 5)。

B1.3. 情報整理及びデータベース (DB) 搭載用のデータシートの作成

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB [有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称 : HESS) : ラットを対象 (今回はマウスも対象) とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース] に搭載できるように形式を整理し作成した (Table 4)。

B1.4. 多変量解析法

収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA17 (Umetrix 社製) で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や毒性の変動に寄している物理化学的性状について同定した。

- 物理化学的情報に基づく主成分分析法 (PCA : Principal Component Analysis) からの階層的クラスタリング解析法 (HCA: Hierarchical Clustering Analysis) の実施により、サンプル間の距離が近

いものからクラスターを形成し、類似度の高いクラス分類した (Figure 1)。

- OPLS 法 : $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ の回帰式から、Y 变数に連動する X 变数を探索する (X 变数を使って Y 变数のモデルを構築する)。今回の解析では物性値を X の説明变数とし、毒性値 (h-CLAT 試験法毒性試験結果) を Y の目的变数として設定し X 变数から Y 变数のモデルを構築し、予測する。
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vitro* 試験での h-CLAT 試験法毒試験結果との関連性について直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を実施した (Figure 2A, 2B)。
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vivo* 試験結果 (鼻部吸入暴露試験について (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を実施した (Figure 3A, 3B,))。
- ①物性 \Leftrightarrow ②*in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験) \Leftrightarrow ③*in vivo* 毒性試験結果 (鼻部吸入暴露試験) について、共通する物性变数について探索した (Figure 4)。

C. 研究結果

C1. データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で得られた OECD からの試験情報に基づいて作成しており、約 65 項目のデータを収集した。収集・整理された 物理化学的性状データシート および *in vitro / in vivo 有害性情報シート* は、このあとの多変量解析のため、以下についてデータマイニングを実施した。

- Composition : impurity の各項目につい

ての検出限界以下 (<) は、「0」と定義した。

- 未測定データ・測定不能データは「空欄」と定義した。
- 範囲がある場合、下限値を採用した。
- O (wt%) : SiO₂(%)の値から換算し算出した。
- AggMorphology: 1: Rounded, medium sphericity / 1.5: Sub-rounded, low to medium sphericity / 2: Angular, low sphericity
- CrystallImpurity: 1: Na₂SO₄, Boehmite (AlO(OH)) / 1.5: Na₂SO₄, Boehmite (AlO(OH)), Boehmite (Al₂O₄) / 2: Na₂SO₄, Boehmite (Al₂O₄) と定義した。
- Sphericity: 1: low / 1.5: low to medium / 2: medium と定義した。
- Solubility[Saturation concentration (mmol/L)] : NM203 は平均値を採用。 NM204 は 1mol=60.08430g から換算した。
- h-CLAT: 陰性の場合、欠損データについては 10000 と定義した。
- h-CLAT : 全て positive だったので、 Classification: 「1.極めて強い、2.非常に強い、3.強い」と数値化により定義した。

C.2.1. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂NPs)の階層的クラスタリング解析による類似度の評価

収集した 65 項目の物理化学的性状（物性）データについての特性解析を実施した結果、類似度は 3 つのグループで示された (Figure 1)。また、最初に大きくクラスター化した要因は PCA (主成分分析法) によりコーティングの有無であった。

C.2.2. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂NPs)の物性データと抗原提示細胞活性化能の関連性解析

5 種の SiO₂ NPs について OECD の公開データからと分担研究の飯島先生からの DLS 測定データより収集した物性データと *in vitro* 毒性試験データ (h-CLAT 試験法結果) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した (Figure 2A)。その結果、毒性と関連する変数 (物性項目) が Loadings Plot の横軸から探査可能であることが示唆された (Figure 2B)。さらに信頼度を加味した解析 (S-plot) を進めた結果、寄与度 0.2 以上、信頼性 0.6 以上の場合の毒性に寄与する変数 (物性項目) として、毒性が強い (NM201) のは、正の相関の高い変数 (物性項目_AggZaverage_Buffer、Total impurity:Total non-SiO₂ content including coating and impurities (% w/w)、Impurity_Al) として、また、毒性が極めて強い (NM204) のは、負の相関の高い変数 (物性項目_DustinessInhaSD、DustinessRespSD、Morphology of aggregates/agglomerates: Angular_low sphericity、Pdi:Ultra-pure water dispersion、Aspect ratio) として示唆された。

C.2.3. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂NPs)の物性データと *in vivo* 毒性試験データの関連性解析

OECD の公開データから収集した 5 種の SiO₂ NPs の物性データと *in vivo* 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した (Figure 3A)。鼻部吸入暴露試験結果の毒性に寄与する重要な物性項目とした特徴変数を解析した結果、毒性が弱い

(NM200、NM201、NM204) は、正の相関の高い変数（物性項目_ParticleSize_1、CoatingYorN(Yes)、AggZaverage_1、Agg2Rg1、CrystalImpurity、Micropore_Vol、Sphericity、PourWaterContent、MicroporeVol、MMAD1、MMAD2) として、また、毒性が強い(NM202、NM203) は、負の相関の高い変数（物性項目_FeretMin(nm)、Impurity_Ca、Coating_N(No)、AggD、AggMorphology(nm)、AggIsoElecPointMean(pH)、AspectRatio、SAXS_SurfArea(m²/g)) として挙げられた (Figure 3B)。

C.2.4. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂ NPs)の物性データと *in vitro / in vivo* 毒性試験結果データ間の共通の物性項目の探索

in vitro / in vivo 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性の相関を Scatter plot にて探索した結果、相関係数 (R=0.4128) は、正の相関であった (Figure 4)。相関はあまり高くはないが、元データを比較してみると信頼性若しくは寄与度は下がるもののが直線上に近い幾つかの物性について共通物性項目 [Impurity_Al、Feret Max (nm)、Micropore surface area (m²/g)、PdI:Ultra-pure water dispersion (intra vial study)] として挙げられた。今回、相関が低かった理由の一つに、NM204の物性の欠損データの多さが影響したと考えられた。

D. 考察

物性データと抗原提示細胞活性化能 (h-CLAT 試験法結果) の関連性解析の結果から、毒性の極めて強い NM204 の物性は、巻き上がり度が高いことが示唆された。一方で、毒性の強い NM201 は、他の検体よりも二次粒子径としての凝集性が高く、また全体の不純物の含有率が多いが、不純物

としてのアルミニウムが特徴的に挙がってきている。これは恐らくコーティング材由来のアルミニウムと推察された。従って、NM201 の毒性の強さに由来する物性は、凝集のし易さとコーティング材の性質が影響しているものと考えられた。

in vivo 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性解析の結果から、毒性の弱い (NM200、NM201、NM204) は、一次粒子径が大きく、コーティングされており、二次凝集性が高い、巻き上がりにくい物性の性質を有することが示唆された。一方で、毒性の強い (NM202、NM203) は、フェレット径は大きく、不純物のカルシウムの含有 (NM200、NM201、NM203 は欠損値)、コーティングが無く、高いアスペクト比と表面積が大きい物性の性質を有する事が示唆された。また、物性のみのクラスタリングで最初に大きくクラスター化した要因もコーティングの有無であったいることから、クラスター化の最初の類似度と *in vivo* の毒性結果との関連性について反映している可能性が示唆された。

in vitro / in vivo 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性項目の探索では、相関が低かった理由の一つに、NM204 の物性の欠損データが多いことが影響したと考えられたことから、欠損データを作らないことや解析では補っていくことの検討が必要であると考える。

E. 結論

5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂ NPs)について、公開された文献や本研究班の分担研究者の測定値などからの約 65 項目の物性および *in vitro / in vitro* 有害性情報を収集・整理した。*in vitro* 有害性情報は本研究班の足利代表者研究者が実施した h-CLAT

法による 5 種の SiO₂ NPs の THP-1 細胞を用いた細胞生存率、CD86 および CD54 発現に与える影響について、*in vitro* 有害性情報は、OECD の公開データより鼻部吸入暴露試験_気管内投与試験結果について纏めた。これらの物性および *in vitro/in vivo* の有害性情報の収集データについては、解析用データに整理・データマイニング後、収集した物性についての特性解析や *in vitro/in vivo* 有害性データとの関連性解析により幾つかの物性項目の特徴を見出した。今後は *in vitro/in vivo* 間の有害性データに共通な物性との相関解析の算出方法について改善し進めていく予定である。

【謝辞】

We are grateful to the JRC Nanomaterials Repository for being the supplier of materials in this study.

F. 研究発表

F.1. 論文発表

A. Ohno, Y. Okiyama, A. Hirose, K. Fukuhara, The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974

F.2. 学会発表

1. Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (Web 開催)(2021.7.7-9) (神戸)
2. 西田 明日香, 足利 太可雄, 大野 彰子, 飯島 一智 : 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9) (神戸)

戸)

3. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
4. Kiyoshi Fukuhara, Akiko Ohno : C-Methylated fisetins with strong antioxidative activities, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
5. 足利太可雄、西田明日香、大野彰子、飯島一智:二酸化ケイ素ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究、第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (Web 開催)、(2022.9.6-9.7)
6. Akiko Ohno, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : The position of nitro group affecting the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes、第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30- 10.2) (横浜)
7. Kiyoshi Fukuhara, Akiko Ohno : Potent radical-scavenging activities of C-methyl fisetins、第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30-10.2) (横浜)
8. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (ハイブリッド開催) (2021.11.1-2) (横須賀)

9. 大野彰子、西田明日香、飯島一智、高橋祐次、広瀬明彦、足利太可雄. *in silico*による TiO₂NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）(2021.11.13, 沖縄)
10. 足利太可雄、西田明日香、大野彰子、飯島一智、二酸化ケイ素ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）(2021.11.13, 沖縄)
11. 西田明日香、足利太可雄、大野彰子、飯島一智、THP-1 細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）(2021.11.13, 沖縄)
12. 鈴尾美穂、三浦結美、西田明日香、足利太可雄、大野彰子、飯島一智、未分化および分化 THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化および MMP-12 遺伝子発現の解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）(2021.11.13, 沖縄)
13. Fukuhara K, Mori K, Okiyama Y, Ohno A, Misawa T, Mizuno M, Demizu Y, Shibanuma M. Rationally designed peptide modulators of A β toxicity in Alzheimer's disease, AIM ECS2021_13th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2021.11.29-12.2, On line)
14. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)
15. 福原潔、森一憲、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子、アミロイド β の神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発、日本農芸化学会 2022 年度大会 (2022.3.15-18, 京都)
16. 大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題:*in silico* 手法によるナノマテリアル有害性評価へのアプローチ、日本薬学会第 142 年会シンポジウム（オンライン開催）(2022. 3. 26)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Table 1 Surveyed substances: Silicon dioxide nanoparticles (SiO_2 NPs, NM200-NM204).

NM	Label name	Crystal type	Surface coating	Composition ($\text{SiO}_2, \geq \%$)
NM-200	Synthetic Amorphous Silica PR-A-02	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	96
NM-201	Synthetic Amorphous Silica PR-B-01	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	97
NM-202	Synthetic Amorphous Silica PY-AB-03	Pyrogenic	uncoating	99
NM-203	Synthetic Amorphous Silica PY-A-04	Pyrogenic	uncoating	99
NM-204	Synthetic Amorphous Silica PR-A-05	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	98

Table 2 Target materials (SiO_2 NPs, NM200-NM204) collected from the organization for economic co-operation and development (OECD) (2A, 2B).

(2A)

項目	タイトル	備考
物理化学的性状	PhysChem_Summary	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報を委託者提供の参考シート (Physicchemical properties of the TiO_2 NPs) の項目に沿って整理
	PhysChem_OECD_Summary dossier	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報
	PhysChem_OECD Part 1 (NM200)	個別dossier (Part 1 – NM 200) に収載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 2 (NM201)	個別dossier (Part 2 – NM 201) に収載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 3 (NM202)	個別dossier (Part 3 – NM 202) に収載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 4 (NM203)	個別dossier (Part 4 – NM 203) に収載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 5 (NM204)	個別dossier (Part 5 – NM 204) に収載された物理化学的性状データ
有害性	反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD	Summary dossierに収載された反復投与毒性(吸入、気管内投与)の情報
	反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD_詳細	“反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD”データシートに整理した情報の詳細情報 (HESS DB形式)

(2B) Results of collected physicochemical properties of five SiO₂ NPs.

Property	Method/Instrument	NM200	NM201	NM202	NM203	NM204
Particle size, size distribution						
Primary d _{4,3} (equivalent diameter for spheres)	SAXS	1	22	22	15	16
Primary particle size (nm)	TEM	2	14±7	17±8	15±7	13±6
Primary particle size (nm)	TEM	3	23±8	19±4	18±3	16±3
Feret Min (nm)	TEM	5	21±8	33	50	53
Feret Max (nm)	TEM	7	34±5	51	37±2	35±5
Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)	TEM	8	5-20 (average size mainly around 10-15)	-	-	-
Composition						
Total non-SiO ₂ content including coating and impurities (% w/w)	EDS	9	1.5	2.2	1.6	0.41
Impurity (% w/w Al)	EDS	10	0.46	0.74	0.45	0.43
Impurity (% w/w Si)	EDS	11	0.87	0.46	0	0.04
Impurity (% w/w Na)	EDS	12	0.88	0.44	0	0.18
Impurity (% w/w Ca)	EDS	13	-	0	0.18	0
Impurity (% w/w K)	ICP-OES	14	0.005-0.01	0.001-0.005	-	-
Impurity (% w/w Fe)	ICP-OES	15	0.005-0.01	0.001-0.005	-	0.001-0.005
Impurity (% w/w Mg)	ICP-OES	17	0.001-0.005	0.001-0.005	-	-
O (wt%)	EDS	18	53.62	53.68	53.14	53.21
Si (wt%)	EDS	19	44.77	45.27	46.23	46.32
Coating	TGA	20	Yes (or H ₂ O)	Yes (or H ₂ O)	No	Yes (or H ₂ O)
Weight of coating (wt%)	TGA	21	3	3	-	3
Agglomeration/aggregation						
Z-average Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	22	207.1±12.3	208.1±34.5	175.9±4.5	172.9±9.2
Pdl Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	23	0.390±0.041	0.352±0.028	0.355±0.003	0.427±0.025
Z-average Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	24	-	197.0±19.7	-	147.5±4.5
Pdl Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	25	-	0.337±0.020	-	0.244±0.017
Z-average Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	26	-	181.5±4.3	-	-
Pdl Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	27	-	0.238±0.008	-	-
Z-average Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	28	-	-	-	146.8±0.6
Pdl Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	29	-	-	-	0.229±0.015
Z-average Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	30	-	240.5±2.3	-	245.7±37.2
Pdl Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	31	-	0.248±0.006	-	0.299±0.024
2Rg1 (nm) Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	32	-	18	20	16
2Rg2 (nm) Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	33	-	440	180	100
Df Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	34	-	2.45	2.45	2.5
Npart/dg Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	35	-	3600	457	200
Morphology of aggregates/agglomerates (nm)	TEM	36	Sub-rounded, low to medium sphericity	Rounded, medium sphericity	Angular, low sphericity	Angular, low sphericity
Zeta Potential around pH 7 (mV)	Laser-Doppler-Electrophoresis	37	-45	-40	-40	-35
Isoelectric Point (Mean) (pH)	Laser-Doppler-Electrophoresis	38	<2	<2	2.4	2.4
Crystalline phase						
Crystalline type	XRD	39	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous
Crystalline impurities	XRD	40	Na ₂ SO ₄ , Boehmite (Al2O3)			
Crystalline size (mean)	-	41	-	-	-	-
Aspect ratio	-	42	-	1461	1518	1533
Specific surface area						
SAXS surface area (m ² /g)	SAXS	43	123±4.9	123±6.3	184±17.8	131±22.9
BET surface area (m ² /g)	BET	44	189.16	140.48	204.11	203.92
Total pore volume (m ³ /g)	BET	45	0.7905	0.5815	0.5136	0.499
Micro pore surface area (m ² /g)	BET	46	30.044	-	-	0
Micro pore volume (mL/g)	BET	47	0.01181	0.00916	0.00684	0
Shape	TEM	48	low to medium	medium	low	low
Surface coating	Weight of coating (wt%)	-	-	-	-	3
Density	Density (g/mL)	-	-	-	-	-
Dustiness	Inhalable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Small rotating Drum (SD)	51	6459±273	6034±199	4988±1886
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)	Smart rotating Drum (SD)	52	2937±193	218±24	91±11
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)	Vortex Shaker (VS)	53	34000	5593	17600
Surface chemistry	D (O)	-	-	67	-	-
	Ei (%)	EOS	54	71.45	-	-
	C (%)	EOS	55	26.3	20.63	-
	Na (%)	EOS	56	5.96	8.28	-
Pour density	Water content (wt% dry)	-	-	-	-	6
	Bulk density (g/cm ³)	Weighing	58	0.12	0.28	0.12
Piorelty	Total pore volume (mL/g)	BET	59	0.12	0.28	0.12
	Micro pore volume (mL/g)	BET	60	0.7905	0.5815	0.5136
Solubility	Saturation concentration (mmol/L)	Flask method	62	2.4±0.03	2.4±0.03	2.2±2.5
Agglomeration/aggregation	Zeta poly buffer (h-CLAT)	DLS	63	-20.95	-18.06	-15.92
Agglomeration/aggregation	Z-average buffer (h-CLAT)	DLS	64	331.23	526.12	420.26
Agglomeration/aggregation	Pdl buffer (h-CLAT)	DLS	65	0.34	0.38	0.42

Table 3 Results of the h-CLAT test using SiO₂ NPs.

		NM-200	NM-201	NM-202	NM-203	NM-204
h-CLAT 判定	h-CLAT	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Classification	Classification	2	3	2	2	1
EC200 (CD54発現濃度閾値)(ug/mL)	EC200	10.3	30.3	19.5	24.8	3.5
CD54の相対発現量の最大値 (%)	CD54Max	1131.5	434.7	4812.2	2795.3	3439.6
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率(%)	CD54MaxSR	82.89	84.92	70.34	71.3	78.67
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度(ug/mL)	CD54MaxConc	1000	1000	1000	1000	100
EC150 (ug/mL)(CD86発現濃度閾値)(ug/mL)	EC150	10000	10000	10000	10000	10000
CD86の相対発現量の最大値 (%)	CD86Max	107.8	95.3	102.9	108.2	127.1
CD86の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率(%)	CD86MaxSR	96.48	97.3	97.37	71.3	85.78
1000ug/mLにおける生存率(%)	1000SR	82.89	84.92	70.34	71.3	77.96

Table 4 HESS database sheet of the nose-only inhalation exposure and intratracheal administration test method using SiO₂ NPs.

Table 5 Results of the nose-only inhalation exposure test using SiO₂ NPs.

TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)_2003_5 days, [Test guideline: TG412, Species: Rat (wister), Administration period (day): 5 (6h/day), 1.16 (\pm 0.36), 5.39 (\pm 0.58), 25.2 (\pm 1.5) mg/m³]

	NM200	NM201	NM202	NM203	NM204
MMAD (μ m)	3.05	3.05	1.25	1.25	3.05
MMAD (μ m)	3.05	3.05	2.85	2.85	3.05
MΦ numbers in BALF ↓	25.2	25.2	5.41	5.41	25.2
Total protein in BALF ↑	25.2	25.2	5.41	5.41	25.2
PMN numbers in BALF ↑	5.39	5.39	5.41	5.41	5.39

Figure 1 Similarity of physicochemical properties data of five SiO₂ NPs by hierarchical clustering analysis after analysis by PCA.

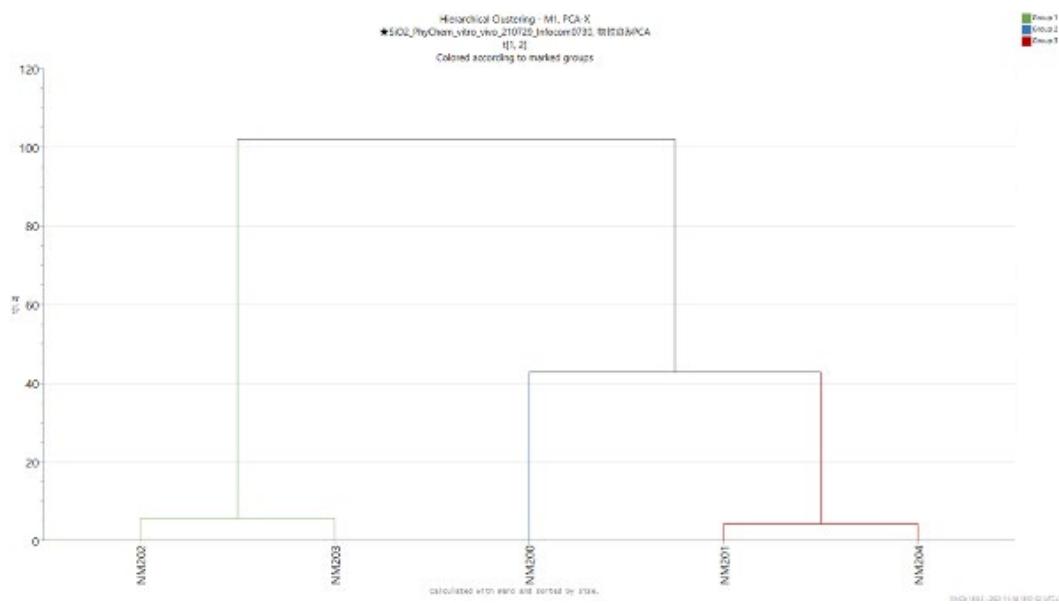
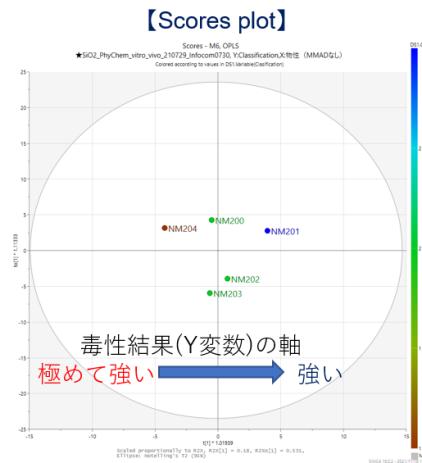


Figure 2 Relationship analysis between physicochemical property data of five SiO₂ NPs and *in vitro* h-CLAT test data.

(2A) Scores plot



(2B) Loadings plot

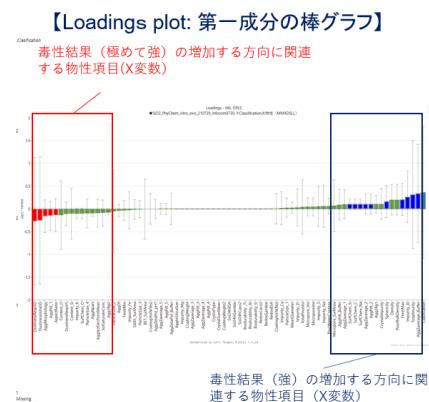
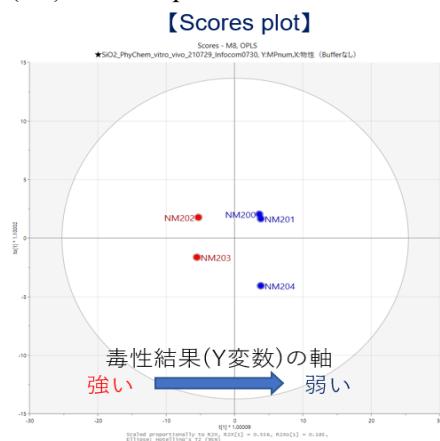


Figure 3 Relationship analysis between physicochemical property data of five SiO₂ NPs and *in vivo* toxicity test data.

(3A) Scores plot



(3B) Loadings plot

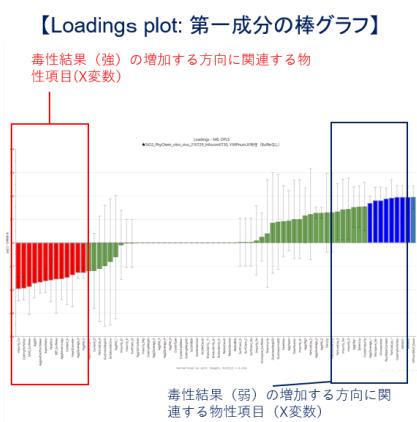
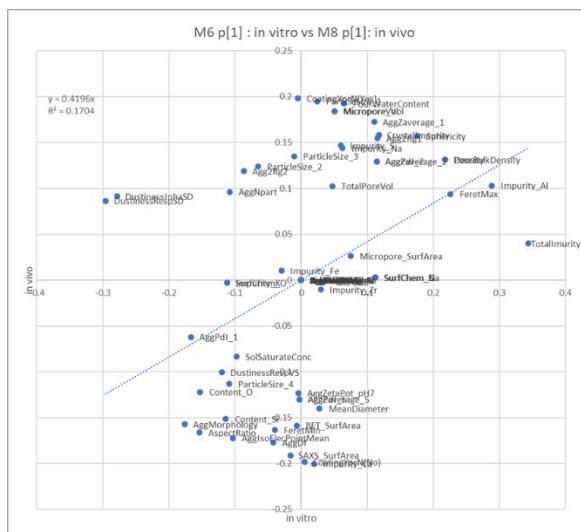


Figure 4 Correlation plot of common physicochemical property data between *in vitro* h-CLAT test data / *in vivo* nose-only inhalation exposure test results data (common physicochemical property variables: scatter plot)



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響評価に関する研究

研究分担者 渡辺 渡

九州保健福祉大学生命医科学部生命医科学科 教授

研究要旨

ナノマテリアルの短期全身曝露による感染性免疫系への影響を評価するため、ナノシリカ NW-204 の複数回の Taquann 法吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。NW-204 はウイルス感染前 7、5 および 3 日に吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させて 5 日後の感染最盛期に評価した。RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、曝露量に依存し有意に上昇した。一方、非感染マウスでは上昇しなかつた。CCL3 と sCD54 でも同様の結果が得られた。肺病理組織学的検討でもこれらサイトカイン・ケモカイン類の結果を反映して、RSV 感染マウスでは NW-204 の曝露量に依存してリンパ球の浸潤や肺胞マクロファージ類の集束などが認められ、RSV 肺炎の増悪化が確認された。特にマクロファージ類の集束は、胸膜下にも局在していた。今後、感染後の期間を延長して病態の変化をより詳細に解析する必要があると考える。

A. 研究目的

ナノマテリアルのマウスへの短期全身曝露吸入を実施して感染免疫を含め免疫機能への影響評価を行い、得られた知見を毒性発現の AOP (毒性発現経路) および *in vitro* 試験法の確立と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見に応用することを目的としている。

今年度は、国立衛研毒性部・高橋祐次先生の研究グループでの Taquann 法によるナノシリカ吸入曝露システムを利用して、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いた複数回（感染前 7,5 および 3 日）の NW-204 吸入曝露による RSV 感染

5 日後（感染最盛期）への影響評価を実施した。

B. 研究方法

ナノシリカ吸入曝露試験

国立衛研において Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、NW-204 を質量濃度 10 および 30 mg/m³ になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。この実験を 1 日おきに 3 回実施した。最終曝露の 1 日後に曝露マウスは、先行研究と同様に SLC (実験動物ブリーダー) に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株 3×10^5 PFU を麻酔下 (ketamine 40 µg/g, xylazine 6 µg/g、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで-80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

肺重量の計測

NW-204 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存している NW-204 のコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。-80°C での凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES)、CCL3 (MIP-1 α) および sCD54 (sICAM-1) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine mouse ELISA キットを用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

肺の標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託した。評価は HE、マッソントリクロムおよび PAS 染色下で検鏡観察により実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した (承認番号 3-1-03)。

C. 研究結果

(1) BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、曝露量に依存し有意に上昇し、30 mg/m³ (高用量) 曝露群では感染対照群と比較して約 2 倍まで上昇していた。また、多様な炎症の場において誘導される CCL3 も RSV 感染マウスでは、同様に NW-204 曝露で上昇していた。一方、これらのケモカインは非感染群では NW-204 曝露の有無にかかわらず、何れのマウスでも検出限界以下であった。これらの結果より、NW-204 が RSV 感染肺炎の増悪因子であることが示唆された。

前年度までの班研究において、CD54 (ICAM-1) がナノシリカ曝露による影響指標の一つであることが示されてきている。細胞表面に発現した CD54 分子は、その発現量に比例して可溶性 CD54 (sCD54) が産生されることが知られているため、ELISA 法で BALF 中の定量を行った。sCD54 量は、RSV 感染により約 3 倍増加したが、NW-204 曝露による影響は 10~20%程度の上乗せ効果に留まった。

(2) 肺の病理組織学評価結果

HE 染色およびマッソントリクロム染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。RSV 感染のみ (0 mg/m³ 曝露) では、葉における偏りは少なく、動脈と細気管支周囲にリンパ球の浸潤など軽度の間質性の肺炎が認められた。NW-204 低用量 (10 mg/m³) 曝露/RSV 感染群では、これらの特徴に加えて局所的なマクロファージの集束が散見され、さらに胸膜下への浸潤も見られた。高用量曝露ではさらに炎症が強まり、肺胞壁の肥厚や胸膜下へのリン

パ球とマクロファージの浸潤が認められた。一方、非感染マウスでは、高用量曝露で部分的に細気管支周囲のリンパ球浸潤はあったが、マクロファージの集束などは全く認められなかった。このように、BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果を反映して、NW-204曝露はRSV感染肺炎を増悪化することが明らかとなつた。

D. 考察

先行研究では、Taquann 全身曝露吸入装置での MWNT-7 複数回の吸入曝露により、カーボンナノチューブが RSV 感染最盛期での肺炎を増悪化することを示してきた。そこで、本研究ではナノシリカ NM-204について、同様に RSV 感染 5 日後の最盛期における病態への影響を評価した。RSV 感染マウスの BALF では、RSV 肺炎の代表的なマーカーである CCL5 (RANTES)と炎症性ケモカイン CCL3 (MIP-1 α) レベルは、NW-204 曝露によりカーボンナノチューブと同様に有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、カーボンナノチューブ曝露では CCL3 の上昇が見られていたのに対し、NW-204 は全く影響が認められなかつた。同様の結果は、sCD54 の曝露でも得られた。これらの結果より、今回の NW-204 の吸入曝露は、正常マウスにおいて炎症を惹起するような免疫刺激にならず、その後の RSV 感染により、細胞に取り込まれていた NW-204 が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。

肺の病理組織学的な検討では、NW-204 曝露のみではリンパ球浸潤などの炎症像はあまり認められず、サイトカイン・ケモカインレベルの結果を良く反映するものであった。そして NW-204 曝露/ RSV 感染群では、ナノシリカ粒子こそ確認されなか

ったがマクロファージの集束が亢進しており、これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類が RSV 感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。特に胸膜下への細胞浸潤は RSV 感染のみ、あるいは NW-204 曝露のみではほとんど観察されなかつた。仮にナノシリカ粒子を貪食した細胞が RSV 感染により浸潤しているのであれば、胸膜へのナノシリカの集積に繋がり、中皮腫のようなより重篤な疾患へのリスクを高める可能性も否定的できない。今後は RSV 感染後の期間を延長するなどの検証が必要と思われる。

E. 結論

1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NW-204 の Taquann 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化した。
2. NW-204 曝露のみでは、肺での炎症はあまり認められなかつた。
3. 肺炎増悪化の指標に、ケモカイン CCL3、CCL5 および sCD54 が利用できる可能性が示された。
4. NW-204 曝露/RSV 感染により、集束化した肺胞マクロファージ類が胸膜下まで局在化していることが判明した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Hashiguchi, S., Miyauchi, A., Komemoto, K., Ueda, T., Tokuda, K., Hirose, A., Yoshida, H., Akashi, T., Kurokawa, M., Watanabe, W. Effects of intranasal administration of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) suspension on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. Fundam. Toxicol. Sci. (2021) 8, 215-220.

F.2 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ambe K, Suzuki M, <u>Ashikaga T</u> , Tohkin M	Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost	<i>Regulatory Toxicology and Pharmacology</i>	125	105019	2021
Nishida H, Otake T, <u>Ashikaga T</u> , Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H	In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential	<i>Toxicology in Vitro</i>	77	105245	2021
Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, <u>Ashikaga T</u>	Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in <i>in Vitro</i> Methods for Skin Sensitization	<i>AATEX</i>	26(1)	9-18	2021
<u>Ashikaga T</u> , Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M	Establishment of a Threshold of Toxicological Concern Concept for Skin Sensitization by <i>in Vitro/in Silico</i> Approaches	日本香粧品学会誌	45(4)	331-5	2021

<u>Taquahashi Y</u> , Saito H, Kuwagata M, Kitajima S	Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals	<i>Fundam Toxicol, Sci.</i>	8(6)	169-175	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, <u>Taquahashi Y</u> , Kanno J, Hirose A, Nakae D	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins	<i>Cancer Sci.</i>	112(6)	2185-2198	2021
Yamamoto E, <u>Taquahashi Y</u> , Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging	<i>Int J Pharm</i>	595	120241	2021
Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, <u>Ishimaru N</u> , Ito HO	Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes	<i>J Clin Biochem Nutr</i>	69(3)	238-246	2021

Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, <u>Ishimaru N</u> , Kudo Y	Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by Fosobacterium nucleatum infection promotes invasion of oral cancer cells	<i>Sci Rep.</i>	11(1)	14943	2021
Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, <u>Ishimaru N</u> , Kamioka H.	Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp 1a1 signaling axis	<i>Sci Rep</i>	11(1)	14927	2021
Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, <u>Ishimaru N</u> , Yin D, Cam M, Kelly MC, Awasthi P, Takada K, Takahama Y	The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8+ T cells in the cortex independent of negative selection	<i>J Exp Med.</i>	218(4)	e20201904	2021
Hashiguchi S, Miyauchi A, Komemoto K, Ueda T, Tokuda K, Hirose A, Yoshida H, Akashi T, Kurokawa M, <u>Watanabe W</u> .	Effects of intranasal administration of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) suspension on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice.	<i>Fundam. Toxicol. Sci.</i>	8	215-220	2021
<u>Taquahashi Y</u> , Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S	A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation	<i>Fundam. Toxicol. Sci.</i>	9(1)	17-21	2022

Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, <u>Ishimaru N</u> , Okazaki T	PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity	<i>Nat Immunol.</i>	23(3)	399-410	2022
Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, <u>Ishimaru N</u> ,	The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa.	<i>Inflammation.</i>	45(3)	1348-1361	2022
Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, <u>Ishimaru N</u> , Fukumoto S, Iwamoto T	von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation.	<i>J Cell Physiol.</i>	237(3)	1964-1979	2022
<u>Ohno Y</u> . Okiyama A. Hirose K. Fukuhara.	The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes	<i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i>	441	115974	2022

令和 4 年 3 月 31 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和 3 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究 (20KD1004)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部 室長

(氏名・フリガナ) 足利 太可雄・アシカガ タカオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関における COI の管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関における COI 委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係る COI についての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係る COI についての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) •該当する□にチェックを入れること。
•分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 4 年 3 月 31 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 金田 幸広

次の職員の（元号） 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理について以下とおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する in vitro/in vivo評価手法開発のための研究 (20KD1004)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・動物管理室・室長

(氏名・フリガナ) 高橋 祐次・タカハシ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェック
クレ一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) •該当する□にチェックを入れること。
•分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年3月25日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人横浜国立大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 梅原 出

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関するin vitro/in vivo評価手法開発のための研究(20KD1004)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 工学研究院 准教授

(氏名・フリガナ) 飯島 一智 (イイジマ カズトシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェック。一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■ 未受講 □
-------------	------------

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ■ 無 □ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 □ 無 ■ (有の場合はその内容:)

(留意事項)
・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年 4月 1日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 徳島大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 河村保彦

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する in vitro/in vivo 評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授
(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■ 未受講 □
-------------	------------

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ■ 無 □ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 □ 無 ■ (有の場合はその内容:)

(留意事項)
・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 4 年 3 月 31 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 金田 幸広

次の職員の令和 3 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究 (20KD1004)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部 主任研究官

(氏名・フリガナ) 大野 彰子・オオノ アキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称 :)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関における COI の管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関における COI 委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係る COI についての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係る COI についての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) •該当する□にチェックを入れること。
•分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 九州保健福祉大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 児玉 修

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関するin vitro/in vivo評価手法開発のための研究(20KD1004)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生命医科学部・教授

(氏名・フリガナ) 渡辺 渡・ワタナベ ワタル

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> ■	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェック
クレ一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■ 未受講 □
-------------	------------

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ■ 無 □ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ■ 無 □ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 □ 無 ■ (有の場合はその内容:)

(留意事項)
・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。